



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi

Official Journal of Atatürk University-Medical Experimental Application and Research Center

Volume 4 • Issue 1 • March 2024

EISSN 2791-8645

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp>

Journal of Laboratory Animal Science and Practices

CHIEF EDITOR / BAŞ EDITÖR

Hakan AYDIN 

Department of Virology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Section Editors / Bölüm Editörleri

Nergis ULAŞ 


Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Başak HANEDAN 

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Mehmet Özkan TİMURKAN 

Department of Virology, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Emrah ÖZAKAR 

Department of Pharmaceutical Technology, Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR 

Department of Pharmaceutical Technology, Atatürk University, Faculty of Pharmacy, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Statistics Editor / İstatistik Editörü

Ömer ELTAS 

Department of Biometrics, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyometri Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Foreign Language Consultants / Yabancı Dil Danışmanı

Başak HANEDAN 

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ADVISORY BOARD / DANIŞMA KURULU

Osman YILMAZ 

Department of Laboratory Animals, Dokuz Eylül University, Faculty of Health Sciences, İzmir, Turkey Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Deneysel Hayvanlar Bölümü, İzmir, Türkiye

Mustafa Sinan AKTAŞ 

Department of Internal Medicine, Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye


Osman AKTAŞ 

Department of Medical Microbiology, Atatürk University, Faculty of Medicine, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

Küşver MAMEDOVA 

Azerbaijan State Agricultural University, Azerbaijan
Azerbaycan Devlet Ziraat Üniversitesi, Azerbaycan

Latif Emrah YANMAZ 

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

Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Cerrahisi Anabilim Dalı, Burdur, Türkiye

Volkan YILMAZ 

Department of Virology, Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Kars, Turkey

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye



Journal of Laboratory Animal Science and Practices

AIMS AND SCOPE

Journal of Laboratory Animal Science and Practices is a scientific, open access, online-only periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is an official publication of the Atatürk University, Medical Experimental Application and Research Center, and published biannually in March and September. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Journal of Laboratory Animal Science and Practices aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level. The journal publishes research articles, reviews and case reports that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The scope of the journal includes but not limited to relevant to the topics of laboratory animals in the fields of medical medicine, veterinary medicine, dentistry, aquaculture, science, agriculture, pharmacy and similar fields in which laboratory animals are used, and all other related interdisciplinary theoretical research.

The target audience of the journal includes researchers and specialists who are interested or working in all fields in the journal's scope.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Journal of Laboratory Animal Science and Practices currently indexed in **DOAJ, EBSCO, TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin**.

All expenses of the journal are covered by the Atatürk University. Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process. All manuscripts must be submitted via the online submission system, which is available at <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>. The journal guidelines, technical information, and the required forms are available on the journal's web page.

Disclaimer

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in the journal reflect the views of the author(s) and not the opinions of the editors, editorial board, and/or publisher; the editors, editorial board, and publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

Open Access Statement

Journal of Laboratory Animal Science and Practices is an open access publication, and the journal's publication model is based on Budapest Access Initiative (BOAI) declaration. All published content is available online, free of charge at <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>. Authors retain the copyright of their published work in the Journal of Laboratory Animal Science and Practices. The journal's content is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC) 4.0 International License which permits third parties to share and adapt the content for non-commercial purposes by giving the appropriate credit to the original work.

From January 2023 onwards, content is licensed under a Creative Commons CC BY-NC 4.0 license. The journal's back content was published under a traditional copyright license however the archive is available for free access.

You can find the current version of the Instructions to Authors at <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ilasp>



Contact (Editor in Chief) / İletişim (Baş Editör)

Hakan AYDIN

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Virology, Erzurum, Türkiye
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı,
Erzurum, Türkiye

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

🌐 <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>

☎ +90 442 231 70 27

Contact (Publisher) / İletişim (Yayıncı)

Atatürk University

Atatürk University, Erzurum, Turkey
Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü 25240 Erzurum, Türkiye

✉ ataunijournals@atauni.edu.tr

🌐 <https://bilimseldergiler.atauni.edu.tr>

☎ +90 442 231 15 16

Journal of Laboratory Animal Science and Practices

AMAÇ VE KAPSAM

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi; bağımsız, tarafsız ve çift-kör hakem değerlendirme ilkelerine bağlı yayın yapan, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezinin açık erişimli bilimsel elektronik yayın organıdır. Dergi, Mart ve Eylül aylarında olmak üzere yılda iki sayı olarak yayınlanmaktadır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi, yüksek bilimsel kaliteye sahip özgün araştırma, derleme ve olgu sunumu türündeki makalelerle literatüre katkı sunmayı amaçlamaktadır.

Dergi kapsamına; laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı tıp hekimliği, veteriner hekimliği, dış hekimliği, su ürünleri, fen bilimleri, ziraat, eczacılık ve benzeri alanlarındaki ulusal ve uluslararası çalışmalar gibi konular girmektedir.

Derginin hedef kitlesini derginin kapsamındaki alanlarda araştırma yapan bilim insanları, amatör ve profesyonel olarak çalışanlar ve bu alana ilgi duyan tüm kişiler oluşturmaktadır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri, International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE) ve National Information Standards Organization (NISO) kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nin editöryel ve yayın süreçleri, Akademik Yayıncılıkta Şeffaflık ve En İyi Uygulama (doaj.org/bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi; **DOAJ**, **EBSCO**, **TÜBİTAK ULAKBİM TR Dizin** tarafından dizinlenmektedir.

Derginin tüm masrafları Atatürk Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır. Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ilasp> sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmelidir. Derginin yazım kurallarına, gerekli formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Sorumluluk Reddi

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen bilgi, fikir ve görüşler Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bilgi ve görüşlerini yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi yazarlara ait bilgi ve görüşler için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir.

Açık Erişim Beyanı

Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi yayınlanma modeli, Budapeşte Açık Erişim Girişimi (BOAI) bildirgesine dayanan açık erişimli bilimsel bir dergidir. Derginin arşivine <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ilasp> adresinden ücretsiz olarak erişilebilir. Yazarlar Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nde yayınlanmış çalışmalarının telif hakkını elinde tutar. Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nin içeriği, Creative Commons Atıf-GayriTicari (CC-BY-NC) 4.0 Uluslararası Lisansı ile yayınlanmaktadır. Söz konusu telif, üçüncü tarafların içeriği uygun şekilde atıf vermek koşuluyla, ticari olmayan amaçlarla paylaşımına ve uyarlamasına izin vermektedir.

2023 Ocak'tan itibaren dergi Creative Commons CC BY-NC 4.0 lisansı ile yayın yapmaya başlamıştır. Bu tarihten önceki dergi içeriği ücretsiz erişime açık olmakla birlikte geleneksel telif sistemiyle yayınlanmıştır.

Yazarlara Bilgi'nin güncel versiyonuna <https://dergipark.org.tr/tr/pub/ilasp> adresinden ulaşabilirsiniz.



Contact (Editor in Chief) / İletişim (Baş Editör)

Hakan AYDIN

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine,
Department of Virology, Erzurum, Türkiye

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı,
Erzurum, Türkiye

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

✉ hakanayd@atauni.edu.tr

🌐 <https://dergipark.org.tr/en/pub/ilasp>

☎ +90 442 231 70 27

Contact (Publisher) / İletişim (Yayıncı)

Atatürk University

Atatürk University, Erzurum, Turkey

Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü 25240 Erzurum, Türkiye

✉ ataunijournals@atauni.edu.tr

🌐 <https://bilimseldergiler.atauni.edu.tr>

☎ +90 442 231 15 16

Journal of Laboratory Animal Science and Practices

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Derlemeler /Reviews

- 1. Tavşanlarda Vitamin Eksiklikleri**
Vitamin Deficiencies in Rabbits
Eylül ÇÜLÜK, Muhammed Sertaç EROĞLU, Ömer AYDIN
page 1-7
- 2. Sıçanlarda ve Farelerde Yaşam Alanı Kriterleri**
Habitat Criteria in Rats and Mice
Sümeyye BAYSAL, Emre EREN, Kerim Emre YANAR
page 8-14
- 3. Yenidoğan Rodent Modellerinde Hiperoksik Beyin Hasarının Değerlendirilmesi**
Examining the Effects of Oxygen Exposure on the Developing Brain Through Murine Models
Canberk YILMAZ, Defne ENGUR, Abdullah KUMRAL, Osman YILMAZ
page 15-25

Araştırma Makaleleri /Research Articles

- 4. Ratlarda Yanık Sonrası Seryum Nitrat ve Plateletten Zengin Plazma Tedavilerinin Akciğer Dokusu Üzerine Etkilerinin Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması**
Investigation of the Effects of Cerium Nitrate and Platelet-Rich Plasma Treatments on Lung Tissue Following Burn Injury in Rats Using Histopathological and Immunohistochemical Methods
İsmail BOLAT, Esra MANAVOĞLU KIRMAN, Kübra Asena TERİM KAPAKİN, Fırat ÖZER
page 26-32
- 5. Ege Bölgesindeki Ruhsatlı Deney Hayvanı Tesislerinde Helicobacter spp. Prevalansı**
The Prevalence of Helicobacter spp. in Licensed Experimental Animal Facilities in Aegean Region, Turkey
Necdet İlker İÇİL, Göksel ERBAŞ
page 33-43
- 6. Eskuletin'in Koruyucu Rolünü Keşfetmek: Sıçan Kalbinde Doksorubisinin Neden Olduğu Oksidatif Stresle Mücadele**
Exploring Esculetin's Protective Role: Countering Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rat Heart
Neslihan ÖZTÜRK, Medine Sibel KARAAĞAÇ, Esra Nur YEŞİLKENT, Murat İSİYEL, Hilal TOSUN, Habibe KARADAŞ, Hamid CEYLAN, Yeliz DEMİR
page 44-52



Tavşanlarda Vitamin Eksiklikleri

Vitamin Deficiencies in Rabbits

Eylül ÇÜLÜK¹

Muhammed Sertaç Eroğlu²

Ömer Aydın²



¹Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Erzurum, Türkiye

²Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç
Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye



Öz

Tavşanların kısa gebelik süresine sahip olmaları ve bir batında çok sayıda yavru dünyaya getirmeleri ve ayrıca yavru bakımı sürelerinin yedi gün gibi kısa bir süre olması nedeniyle laboratuvar hayvanı olarak kullanımları önem taşımaktadır. Ayrıca tavşanlar ekonomik, ekolojik ve halk sağlığı açısından da önem arz etmektedir. Tavşanlarda birçok faktör patolojik bozukluklara neden olabilmektedir. Bu nedenle farklı risk faktörleri, ölüm ya da hastalık nedenleri ve yaygınlık oranları hakkındaki bilgiler; sağlık, ekonomi ve refah açısından öneme sahiptir. Tavşanlarda bu patolojik bozukluklara neden olan durumlardan biri de vitamin eksikliklerinden (hipovitaminozis) kaynaklanmaktadır. Tavşanlar bakım, besleme ve barınma koşullarına göre çeşitli vitamin eksikliklerinden muzdarip olabilirler. Kalabalık barınaklarda yaşama, yetersiz ve kalitesiz besleme, güneş ışığından yoksun ortamda barınma gibi koşullar ya da sindirim sistemi problemleri hipovitaminoz durumlarına yol açabilir. Tavşanlarda vitamin eksiklikleri verim ve üreme performansında düşüklük, abortus, zayıf yavru doğumu, konjenital hidrosefali, anemi, oküler bozukluklar, osteolojik hastalıklar ve kaslarda distrofi gibi birçok farklı probleme yol açabilir. Bu derlemede tavşanların diyetle alması gereken vitamin miktarları ve eksikliklerinde görülebilecek patolojik durum ve hastalıkların bir araya getirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tavşan, Vitaminler, Vitamin Eksikliği

ABSTRACT

The use of rabbits as laboratory animals is important because they have a short gestation period and give birth to a large number of offspring in one litter, as well as a short period of care for offspring, such as seven days. Rabbits are also important in terms of economic, ecological and public health. Many factors can cause pathological disorders in rabbits. Therefore, information on different risk factors, causes of death or morbidity, and prevalence rates; It is important for health, economy and welfare. One of the conditions that cause these pathological disorders in rabbits is due to vitamin deficiencies (hypovitaminosis). Rabbits may suffer from various vitamin deficiencies depending on their care, feeding and housing conditions. Conditions such as living in crowded shelters, inadequate and poor-quality nutrition, sheltering in an environment devoid of sunlight, or digestive system problems can lead to hypovitaminosis states. Vitamin deficiencies in rabbits can lead to many different problems such as poor yield and reproductive performance, abortion, weak offspring, congenital hydrocephalus, anemia, ocular disorders, osteological diseases and muscular dystrophy. In this review, it is aimed to bring together the pathological conditions and diseases that can be seen in the vitamin amounts and deficiencies that rabbits should take with the diet.

Anahtar Kelimeler: Rabbit, Vitamins, Vitamin Deficiency.

Geliş Tarihi/Received 01.03.2023

Kabul Tarihi/Accepted 22.06.2024

Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:

Muhammed Sertaç EROĞLU

E-mail: msertac.eroglu@atauni.edu.tr

Cite this article: Çülük E, Eroğlu M. S., Aydın Ö (2024). Vitamin Deficiencies in Rabbits. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(1), 1-7.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Vitaminler doku onarımı, kemik ve diş oluşumu ve sağlığı dahil olmak üzere çok sayıda fizyolojik göreve sahiptir. İnsanlar ve hayvanlar tarafından, sağlığı korumak ve çeşitli fizyolojik işlevleri sürdürmek için yaşam boyunca değişen miktarlarda vitaminlere ihtiyaç duyulmaktadır (Godswill ve ark., 2020).

Vitaminlerin bir kısmı bazı canlılar tarafından yeterli miktarlarda sentezlenemez. Bu sebepten dolayı, vitaminler oral beslenme ya da gastrointestinal florada mikrobiyal aktivite yolu ile sağlanmalıdır (Watson ve ark., 2019; Lebas, 2000).

Vitaminler en yaygın olarak çözünürlüklerine göre; suda çözünen (B kompleks vitaminler ve C vitamini) ve yağda çözünebilir (A, D, E ve K vitamini) vitaminler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Tablo 1). Vücutta A, B12 ve folik asit karaciğerde, D ve E vitaminleri adipoz dokuda ve kaslarda, E vitamini ayrıca karaciğerde depolanmaktadır (Stevens, 2021; Godswill ve ark., 2020).

Tavşanlarda suda çözünen vitaminler önemli miktarlarda sindirim sistemi florasında (esas olarak sekumda) sentezlenmektedir. Bu vitaminlerin bir kısmı ince bağırsakların distalinden direkt olarak emilmektedir ve büyük bir kısmı bakteriler tarafından kullanılmaktadır. Yumuşak dışkının yenilmesi ile alınan bakterilerin tahrip edilmesinden sonra açığa çıkan bu vitaminler tavşanların ince bağırsağından geri emilmektedir. Bu kaprofajinin ana faydalarından biridir. Bu yolla tavşanlar gerekli olan tüm B kompleks ve C vitaminini elde edebilirler (Mateos ve ark., 2020; Lebas, 2000).

Yağda çözünen vitaminler diyetle fazla bulunduğu yağ hücrelerinde depolanır ve bu vitaminlerin alınması sonucu toksikasyon bulguları şekillenebilir. A, D ve E vitaminleri tavşanların pelet yemlerinde de bulunur fakat bu vitaminler hızlı bir şekilde denatüre olabilirler (McWilliams, 2001).

Tavşanlar için tavsiye edilen vitamin miktarları değişkendir. Bu miktar yaş ve üreme dönemlerine göre değişkenlik gösterir (Tablo 2) (McWilliams, 2001).

Tablo 1. Vitaminler ve özellikleri (McDowell, 2012).

Table 1. Vitamins and properties (McDowell, 2012).

Vitamin	Sinonim	Çözünürlük
A	Retinol	Yağda çözünür.
D ₂	Ergokalsiferol	Yağda çözünür.
D ₃	Kolekalsiferol	Yağda çözünür.
E	Tokoferol	Yağda çözünür.
K	Naftokinon	Yağda çözünür.
B ₁	Tiamin	Suda çözünür.
B ₂	Riboflavin	Suda çözünür.
B ₃	Niasin	Suda çözünür.
B ₅	Pantotenik asit	Suda çözünür.
B ₆	Pridoksal	Suda çözünür.
B ₁₂	Kobalamin	Suda çözünür.
C	Askorbik asit	Suda çözünür.

Tavşanlarda A Vitaminini Eksikliği

Tavşanlarda A vitamini ihtiyacı beta karoten ile verimli bir şekilde karşılanabilir. Tavşanların bağırsak mukozası beta karoteni retinole dönüştürebilir. Her bir beta karoten molekülü 2 parçaya bölünür ve sonunda bir retinol molekülü meydana gelir. Fakat bu dönüşümün şekillenebilmesi için bağırsak mukozası sağlıklı olmalıdır. Rasyonda beta karoten yüksek konsantrasyonlarında olsa bile (40-100 mg/kg) tavşanlarda kanda, karaciğerde ya da ovaryumlarda beta karoten varlığı saptanmamıştır. Dolayısıyla beta karotenin etkili bir şekilde A vitaminine dönüştüğü tek yerin bağırsak mukozası olduğu bildirilmektedir (Lebas, 2000).

Tablo 2. Tavşanlar için önerilen diyet vitamin konsantrasyonlarının dönemsel değişimi (McWilliams, 2001).**Table 2.** Periodic variation of recommended dietary vitamin concentrations for rabbits (McWilliams, 2001).

VİTAMİN	MİKTAR	BÜYÜMEKTE OLAN TAVŞANLAR (4-12 Hafta)	EMZİREN TAVŞANLAR	GEBE TAVŞANLAR	ERKEK TAVŞANLAR	BESİDEKİ TAVŞANLAR
A	UI/kg**	6,000	12,000	12,000	6,000	10,000
D	UI/kg	800-1,000	800-1,000	800-1,000	800-1,000	800-1,000
E	ppm***	50	50	50	50	50
K	ppm***	0	2	2	0	2
C	ppm***	0	0	0	0	0
B1	ppm***	2	*	0	0	2
B2	ppm***	6	*	0	0	4
B6	ppm***	2	*	0	0	2
B12	ppm***	0.01	0	0	0	0.01
Folik asit	ppm***	5	*	0	0	5
B5	ppm***	20	*	0	0	20
B3	ppm***	50	*	*	*	50
B7 ya da H	ppm***	0.2	*	*	*	0.2

A vitamini tavşanlarda üreme performansı ve tüy kalitesi için oldukça önemlidir. A vitamini eksikliğinde fertilitede azalma, konjenital anomaliler, fetal rezorbsiyon, abort, zayıf yavru doğumları, kornea ve konjunktivada lezyonlar şekillendiği ifade edilmiştir (McWilliams, 2001). Genç tavşanlarda A vitamini eksikliği kulak kıkırdağında defektlere neden olarak kulak sarkmalarına yol açabilmektedir (Claire ve ark., 2004). Deneysel olarak hipovitaminosis A oluşturulmuş tavşanlarda yapılan çalışmalarda fertilitite bozuklukları, halsizlik, tüy dökülmesi ve kilo kaybı şekillendiği rapor edilmiştir. Ayrıca ana belirtiler olarak kseroftalmi ve körlük saptanmıştır. Vitamin A eksikliği semptomu fark edilen 68-80 günlük yaştaki genç tavşanlarda ve 80-110 günlük yaştaki yetişkin tavşanlarda yapılan hematolojik analizlerde anemi ve lökopeni belirlenmiş, lenfosit miktarı artarken, nötrofil miktarının azaldığı bildirilmiştir (Srvanthi ve ark., 2013).

A vitamini eksikliğinden kaynaklanan deneysel konjenital hidrosefalinin araştırıldığı bir diğer çalışmada dişi tavşanlara çiftleşmeden önce 38 hafta kadar ve gebelik sırasında A vitamininden yoksun bir diyet verilmiştir. Annelerden doğan 51 yavrunun 47'sinde hidrosefali tespit edildiği bildirilmiştir. Hidrosefalinin nedenin tam olarak belirlenemediği ancak beyin omurilik sıvısının aşırı üretimi ve muhtemelen serebral sıvı kanalının daralmasından dolayı oluşabileceği bildirilmiştir (Millen ve ark., 1954; Claus, 2012).

Şiddetli eksiklik veya toksisite durumları dışında, tavşanlar homeostaz ile kan serumundaki A vitamini seviyelerini oldukça sabit tutmaktadırlar. Bu nedenle serum seviyeleri tavşanların gerçek A vitamini durumunu tam olarak yansıtmayabilir. Bundan dolayı karaciğer, A vitamini düzeyi açısından daha güvenilir değerler sağlamakta ve altın standart olarak kabul edilmektedir (Claire ve ark., 2004). A vitamininin toksik seviyeleri abort, yavru ölümleri, hidrosefali, zayıf ve küçük yavru ve fetal rezorpsiyon gibi sorunlara neden olabilmektedir. A vitamini eksikliğinde de benzer belirtiler meydana gelebildiğinden toksik A vitaminozisle ayırımının dikkatli bir şekilde yapılması gerekmektedir. Tavşanlarda A vitamini gereksinimleri üzerine az sayıda araştırma yapılmıştır ve besinlerle alınması gereken miktarın 6.000-10000 IU/kg düzeyinde olması tavsiye edilmektedir (Halls, 2010).

Tavşanlarda B kompleks Vitaminler ve Eksiklikleri

Tiamin (B1 vitamini), karbonhidratların ve yağların metabolize edilmesi için gerekli olan belirli enzimlerin bir kofaktörüdür. Tiamin eksikliğinde iştahsızlık ve kas

paralizleri meydana gelmektedir (Blas & Wiseman, 2010).

Riboflavin (B2 vitamini) ve niasin (B3 vitamini) vitaminlerinin fonksiyonları benzerdir ve hücrelerde glikozun okside edilmesinde rol oynayan çeşitli bileşiklerin yapımına katılmaktadırlar. Niasinin, triptofan amino asidi tarafından sentezlendiği belirtilmektedir. Riboflavin eksikliğinin ise büyüme hızının gecikmesine ve yemden yararlanmanın azalmasına yol açtığı bildirilmektedir (Halls, 2010; Blas & Wiseman, 2010).

Pantotenik asit (B5 vitamini), enerji metabolizması için önemlidir. Tavşanlarda pantotenik asit eksikliğinin şekillenmediği belirtilmektedir (Halls, 2010).

Pridoksin (B6 vitamini) amino asit metabolizmasında görev almaktadır. Ticari tavşan yemlerinde bu vitaminin bolca bulunması sebebiyle pridoksin eksikliğinin tavşanlarda ender olduğu belirtilmektedir. İlaveten hem tahıllarda bulunmakta hem de bağırsakta flora bakterileri tarafından sentezlenmektedir (Halls, 2010).

Biotin (B7 vitamini) yağ asidi metabolizmasında rol oynamaktadır. Eksikliğinde dermatit ve tüy örtüsünün kaybı gibi klinik bulguların görüldüğü belirtilmektedir (Blas & Wiseman, 2010).

B9 vitamini gebelik sırasında anemiyi önlemektedir. Ayrıca yağ metabolizmasında, kas gelişiminde ve bağışıklıkta kullanılan çeşitli amino asitlerin sentezine yardımcı olmaktadır. Folat ve folik asit B9 vitamininin farklı formlarıdır. Folat, piridoksal fosfat (B6) enziminin metabolik reaksiyonlarını tamamlamaktadır. Folik asit ise, hücre bölünmesi, deoksiribo nükleik asit (DNA) ve ribonükleik asit (RNA) üretimi için gereklidir ve kansere neden olabilecek DNA değişikliklerinin önlenmesine yardımcı olmaktadır. B9 eksikliği anemi, depresyon, kalp hastalığı ve kanser oranlarında artış, iştah kaybı ve kilo kaybına neden olmaktadır (Blas & Wiseman, 2010).

Kobalamin ve siyanokobalamin (B12 vitamini) karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında önemli olan aktif bir koenzimdir. Ayrıca çeşitli bileşiklerin oksidasyonuna yardımcı olmaktadır. B12 vitamini ayrıca doku sentezi, mitokondriyal enerji metabolizması, hücre plazmasının membran bütünlüğünün korunmasına, sinir hücreleri ve kırmızı kan hücrelerinin üretimine ve DNA'nın onarımına yardımcı olmaktadır. B12 eksikliği; anemi, kabızlık, kalp hastalığı, depresyon, halsizlik, nörolojik bozukluklar, mide bulantısı, abdominal gerginlik, iştah kaybı, ve ağrı gibi klinik bulgulara neden olmaktadır

(Habeb ve ark., 2018).

Tavşanlarda sindirim sistemi hastalıklarında yumuşak dışkı çıkarılması ve bu dışkının daha sonra oral yolla alınması aksamaktadır. Dolayısıyla vitaminlerin sindirim sistemi florası tarafından sentezi bozulmaktadır. B vitamini deposunun ise sadece B12 vitamini için önemli olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle sindirim bozukluğu olan tavşanların suda çözünen vitaminlerin eksikliğine sağlıklı olanlara göre daha duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Bu sebeplerden dolayı süttten kesilme dönemindeki tavşanlar gibi sindirim bozuklukları riski taşıyan tavşanların yemlerine B kompleks vitaminleri eklemenin faydalı olabileceği tavsiye edilmektedir (Lebas, 2000).

Tavşanlarda D Vitamini Eksikliği

D vitamini, kalsiyum homeostazı (kalsiyumun intestinal ve renal emilimi) paratiroid hormon konsantrasyonunun regülasyonu ve kemiklerde osteoklastların olgunlaşmasının uyarımı dahil olmak üzere vücutta birçok farklı süreci kapsayan önemli bir vitamindir (Watson ve ark., 2019; Sabeeh & AL-Saeed, 2020). Evcil tavşanlarda D vitamini metabolizması kalsiyumdan bağımsızdır çünkü tavşanların kalsiyumu bağırsaklardan pasif olarak absorbe ettiği bilinmektedir ve total serum kalsiyum konsantrasyonlarının diğer memeli türleri için bildirilen düzeyden %30-50 kat daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Watson ve ark., 2019).

D vitaminin ergokalsiferol (D2 vitamini) ve kolekalsiferol (D3 vitamini) olmak üzere iki formu bulunmaktadır. D2 vitamini mantar gibi bitkisel kaynaklarda bulunurken D3 vitamini balık yağı, karaciğer, morina yağı, yumurta sarısı ve süt ürünleri gibi gıdalarda bulunmaktadır ya da güneş ışınının maruziyeti ile endojen deri sentezi yoluyla üretilmektedir (Sabeeh & AL-Saeed, 2020). Dolayısıyla D vitamini içeren yem veya bitkilerin yenilmesi ve ultraviolet B (UVB) ışına maruz kalma sonucu fotokimyasal sentez yolu ile gereksinimi karşılanır (Emerson ve ark., 2014).

Tavşanlar da dahil olmak üzere birçok omurgalı türü D vitaminini UVB ışını yolu ile elde edebilmektedir. Bu durum doğal koşullar altında veya açık havada barındırılan hayvanlar için güneş ışığına maruz kalması ile sağlanmaktadır. Fakat hayvanlar içeride barındırıldığında cam ya da akrilik pencereler UVB ışınına karşı etkili bir bariyer oluşturmaktadır. Kapalı ortamda bakılan evcil tavşanların D vitamini üretmesi UVB maruziyetine bağlıdır ve eğer sağlanmaz ise D vitamini eksikliği yaşanabileceği belirtilmektedir (Watson ve ark., 2019). Hipovitaminoz D durumu eksojen D vitamini öncüllerinin diyetle yetersiz alımı, endojen öncülerin dönüşümü için gerekli olan doğal

güneş ışığına maruz kalmanın olmaması veya yetersiz olması ile şekillenmektedir. Güneş ışığı almayan kafeslerde tutulan tavşanlar, güneş ışığına erişimi olmayan ev tavşanları ve samana erişimi olmayan zayıf bir diyetle seçici beslenen tavşanların D vitamini eksikliğine daha predispoze olduğu bildirilmektedir (Winnepenninckx, 2020).

Tavşanlarda uygun olmayan besleme ve kapalı bir arada barınmanın olması hipovitaminoz D ve hipokalsemiye bağlı metabolik kemik hastalığına yol açmaktadır. Bu durum dişlerin dökülmesine yatkın hale getiren kemik demineralizasyonuna neden olmakta, maloklüzyona ve anormal aşınmaya yol açmakta, premolar çıkıntılara ve kesici dişlerin aşırı büyümesine neden olmaktadır. Ayrıca diş kökleri maksilla ve/veya mandibulaya doğru uzanarak rinit, epifora, dakriosistit ve apselere yol açmaktadır (Winnepenninckx, 2020). Erkek tavşanlarda yapılan bir çalışmada D vitamininin sperm motilitesi ve spermatozoa üzerine direk pozitif etkisi olduğu gösterilmiştir (Sabeeh & AL-Saeed, 2020).

D vitamini eksikliği tavşanlarda raşitizm ve dental problemler ile ilişkilendirilmiştir. Yetersiz D vitamini içeren diyetle beslenen tavşanlar, iskelet mineralizasyonunda aksaklık ve osteomalazi belirtileri göstermektedir. Ortaya çıkan osteopeninin özellikle dişleri çevreleyen kemikleri zayıflattığı varsayılmaktadır. Yine de, hipovitaminoz D'nin diş sağlığı üzerindeki etkisi tavşanlarda tam olarak belirlenmemiştir (Franklin, 2017).

Kronik D vitamini eksikliğinin tavşanlarda iskelet sistemi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçlayan bir çalışmanın sonuçlarına göre; D vitamini eksikliği olan bazı tavşanlar normal serum fosfor seviyelerini koruyabilse de, diğer tavşanlarda serum fosfor seviyeleri önemli ölçüde düşmüştür. Bu tavşanlarda ortaya çıkan hipofosfatemi, yetersiz iskelet mineralizasyonuna ve klasik osteomalazi belirtilerine yol açmıştır (Brommage ve ark., 1988).

Tavşanlarda D vitamini ihtiyacının karşılanması için endojen olarak metabolize edilmesi, güneşte kurutulmuş bitkilerin yenilmesi veya bir vitamin takviyesi kullanılması gerekmektedir. Tavşanlar, sonbaharda düşen ağaç yaprakları gibi kurumuş bitkileri yemekten hoşlanırlar ve genellikle o sırada ihtiyaç duydukları D vitaminini almış olurlar. Ayrıca ticari tavşan pelet yemleri de D vitamini ile desteklenmektedir. Evcil tavşanlar için 800-1200 IU/kg düzeyinde D vitamini tavsiye edilmektedir. 2300 IU/kg'ın üzerindeki seviyelerinin toksik olduğu bildirilmektedir. Diyet uygulamasıyla D vitamini toksisitesine neden olma riski göz önüne alındığında, tavşanları güneş ışığına maruz bırakmanın daha uygun olduğu ifade edilmektedir. Ayrıca

güneş ışığının birçok yararlı fizyolojik ve psikolojik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Smith, 2013).

Tavşanlarda E Vitamini Eksikliği

Tavşanlar, E vitamini eksikliğine en duyarlı laboratuvar hayvanlarıdır ve bunu azalan duyarlılık sırası ile kobaylar, hamsterler, sıçanlar, fareler ve maymunlar takip etmektedir. Dolayısıyla tavşanlar, E vitamininin fizyolojik rolünü belirlemek için model olarak kullanılmıştır. E vitamini, dokularda hasar oluşturan hidrojen peroksidin çoğalmasını önleyen bir antioksidandır. Diyetlere selenyum eklenmesi, çeşitli türlerde E vitamini gereksinimleri üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olsa da bu etki tavşanlarda görülmemektedir (Claire ve ark., 2004).

E vitamini, oksitleyici ajanları hücre zarından uzaklaştırmak için önemlidir. Bu hücresel işlevi uzun ömürlülüğü arttırmaktadır. Hipovitaminoz E, üreme yetersizliğine ve kaslara zarar veren miyopatiye (artan kan kreatin fosfokinaz düzeyinden dolayı) neden olmaktadır (McWilliams, 2001). E vitamini ve selenyum takviyesinin, erkek tavşanların büyümesine katkı sağlamanın yanı sıra yem ve su alımını da olumlu yönde etkilediği ve dişi tavşanların üreme özelliklerini iyileştirdiği belirtilmektedir (Oladimeji ve ark., 2022).

Yavrularda E vitamini eksikliğinin başlıca, arka bacaklarda parezisten felce kadar olan kas distrofilerine neden olduğu belirtilmiştir. Klinik hastalığın başlamasından sonraki bir iki gün içinde genellikle ölüm meydana gelmektedir. Yetiştiricilerin kısırlık, abortlar, ölü doğumlar ve hemolizler ile ilgili problemler yaşadığı ifade edilmiştir. E vitamini eksikliği, in vitro peroksit hemolitik testi, serum kreatin fosfokinaz veya E vitamini karaciğer seviyeleri ile teşhis edilebilir (Castellini ve ark., 2007; Claire ve ark., 2004).

E vitamini eksikliğinde önce kalp kası hasarı meydana gelmesi durumunda, daha önce herhangi bir belirti olmaksızın ani ölümler şekillenebilir. Yapılan bir araştırmada E vitamini açısından düşük bir diyetin kullanıldığı tavşanlarda yüksek ölüm oranı gözlemlenmiştir (Lebas, 2000).

Günlük E vitamini ihtiyacı, minimum 25 mg/kg E vitamini içeren bir diyetle karşılanabilmektedir. Tavşanlar için diyetteki düzeyi günlük 16.8 mg/kg'dan az ise hipovitaminoz E meydana geleceği belirtilmiştir (Lebas, 2000).

Yapılan bir diğer çalışmada ise oral E vitamini takviyesinin, immün fonksiyonların uyarılması yoluyla hayvanın yaşam kalitesini iyileştirerek kırmızı kan hücreleri, hemoglobin (HGB) ve total beyaz kan hücreleri (WBC)'nin yanı sıra sodyum ve klor seviyelerini koruduğu belirtilmiştir. Bu korumanın ise tavşanlarda hipotermimin kısa süreli olarak olumsuz etkilerini hafiflettiği, dolayısıyla hipotermiye neden olabilecek durumlarda yaşam kalitesini artırmak için E vitamininin kullanılabilmesi belirtilmiştir (Johnson ve Loriam, 2020). Yapılan bir başka çalışmada ise 35°C'de ısı stresine maruz bırakılan tavşanlarda E vitamini ve selenyum takviyesinin rektal ısının ve deri ısısının düşmesine katkı sağladığı ifade edilmektedir (Oladimeji ve ark., 2022).

Tavşanlarda K Vitamini Eksikliği

K vitamini koagülasyon mekanizmasında rol oynar ve kanın pıhtılaşmasında aktif rol oynamaktadır. K vitamini eksikliğinin belirtileri arasında abort, plasenta kanaması ve yaralanmayı takiben uzamış pıhtılaşma süresine sebep olduğu belirtilmektedir. Eksikliği tavşanlarda nadiren görülmektedir çünkü gereksinimleri bağırsakta mikrobiyal flora tarafından üretilmektedir ve yumuşak dışkıının yutulması yoluyla sağlanmaktadır. Yemdeki 1 ila 2 ppm K vitamini düzeyinin eksikliğinin oluşmaması için yeterli olduğu ifade edilmektedir. Ancak gebe tavşanlarda ve subklinik koksidiyoz vakalarında takviyesinin gerekli olduğuna yer verilmiştir (Halls, 2010).

SONUÇ

Sonuç olarak tavşanlarda özellikle A, D ve E vitaminlerinin yetersizliğinden kaynaklanan çeşitli problemlerle karşılaşılabilir. Bunların önüne geçebilmek için uygun bakım ve besleme koşullarının sağlanması ve hayvanların yeterli güneş ışığına maruz bırakılmaları önerilmektedir. Evcil tavşanlar için önerilen vitamin seviyelerinin kurutulmuş temel diyetlerde bulunmasına özen gösterilmelidir. Çünkü meyve, yapraksız sebze ve tahıl ürünleri gibi taze yemlerin sürekli tedarik durumu ve muhafazası kurutulmuş yemlere kıyasla daha zordur. Ayrıca taze gıdaların hastalık etkenleri ile kontaminasyon ihtimali düşünüldüğünde işletmeler için kurutulmuş yemlemenin daha elverişli olduğu düşünülmüştür. Kurutulmuş yemlerle besleme sayesinde hipovitaminoz nedenli birçok sağlık probleminin elemine edileceği de düşünülmektedir.

Yazar Katkıları: Fikir-E.Ç, Ö.A; Tasarım- E.Ç, M.S.E; Denetleme-M.S.E, Ö.A; Kaynaklar-E.Ç; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi-E.Ç, M.S.E; Analiz ve/ veya Yorum- E.Ç, M.S.E ; Literatür Taraması-E.Ç, M.S.E ; Yazıyı Yazan- E.Ç, M.S.E; Eleştirel İnceleme-M.S.E, Ö.A

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Author Contributions: Concept-E.Ç, Ö.A.; Design-E.Ç, M.S.E; Supervision- M.S.E, Ö.A; Resources- E.Ç; Data Collection and/or Processing- E.Ç, M.S.E ; Analysis and/or Interpretation- E.Ç, M.S.E; Literature Search- E.Ç, M.S.E; Writing Manuscript- E.Ç, M.S.E ; Critical Review- M.S.E, Ö.A

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.




Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

- Mateos, G. G., Rebollar, P. G., & Blas, C.D. (2010). Nutrition of the Rabbit. In C.D. Blas & J. Wiseman (Eds.), Minerals, Vitamins and Additives (pp. 119–150). CABI Publishing.
- Brommage, R., Miller, S. C., Langman, C. B., Bouillon, R., Smith, R., & Bourdeau, J. E. (1988). The effects of chronic vitamin D deficiency on the skeleton in the adult rabbit. *Bone*, 9(3), 131-139.
- Castellini, C., Mourvaki, E., Dal Bosco, A., & Galli, F. (2007). Vitamin E biochemistry and function: A case study in male rabbit. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(3), 248-256.
- Claire, M. B., Kennett, M. J., & Besch-Williford, C. L. (2004). Vitamin A toxicity and vitamin E deficiency in a rabbit colony. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(4), 26-30.
- Clauss, M. (2012). Clinical technique: Feeding hay to rabbits and rodents. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 80-86.
- Emerson, J. A., Whittington, J. K., Allender, M. C., & Mitchell, M. A. (2014). Effects of ultraviolet radiation produced from artificial lights on serum 25-hydroxyvitamin D concentration in captive domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculi*). *American Journal of Veterinary Research*, 75(4), 380-384
- Godswill, A. G., Somtochukwu, I. V., Ikechukwu, A. O., & Kate, E. C. (2020). Health benefits of micronutrients (vitamins and minerals) and their associated deficiency diseases: A systematic review. *International Journal of Food Sciences*, 3(1), 1-32.
- Habeeb, A. A., Sharoud, M. N., Basuony, H. A., & Michael Ml. (2018). Effect of environmental climatic conditions on levels of some hormones, vitamins and trace elements in blood and seminal plasma of rabbits. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances*, 1(1), 18-23.
- Halls, A. E. (2010). Nutritional requirements for rabbits. Retrieved September, 21, 2014.
- Johnson, N. C., & Iorliam, B. (2020). Effect of oral vitamin E supplementation on blood and some electrolyte parameters of rabbit with short-term hypothermia. *International Journal of Advanced Research and Publications*, 4(5), 6-9.
- Lebas, F. (2000). Vitamins in rabbit nutrition: Literature review and recommendations. *World Rabbit Science*, 8(4), 185-192.
- Mateos, G. G., Garla-Rebollar, P., & de Blas, C. (2020). Minerals, vitamins and additives. In "Nutrition of the Rabbits". Eds., De Blas C., Wiseman J., 3th ed., 126-133, CABI Publishing, Boston.
- McDowell, L. R. (2012). Vitamins in animal nutrition: comparative aspects to human nutrition. *Academic Press INC*, California.
- McWilliams, D. A. (2001). Nutritional pathology in rabbits: Current and future perspectives. In Prepared and Presented for the Ontario Commercial Rabbit Growers Association (OCRGA) Congress (Vol. 20).
- Millen, J. W., Woollam, D. H. M., & Lamming, G. E. (1954). Congenital hydrocephalus due to experimental hypovitaminosis A. *Lancet*, 267, 679-683.
- Oladimeji, A. M., Johnson, T. G., Metwally, K., Farghly, M., & Mahrose, K. M. (2022). Environmental heat stress in rabbits: Implications and ameliorations. *International Journal of Biometeorology*, 1-11.
- Sabeeh, A. R., & AL-Saeed, M. H. (2020). Evaluation the role of supplementation of vit. d on some physiological parameters, semen quality in hypovitaminosis d male rabbits induced by furosemide. *Basrah Journal of Veterinary Research*, 19(2), 259-280.
- Smith, M. V. (2013). Textbook of rabbit medicine. *Elsevier Health Sciences*.
- Sravanthi, A. K., Parihar, N. S., Sharma, A. K., & Sastry, V. R. B. (2013). Experimental hypovitaminosis A in rabbits.
- Stevens SL. Fat-Soluble Vitamins. *Nurs Clin North Am*. 2021 Mar;56(1):33-45
- Watson, M. K., Mitchell, M. A., Stern, A. W., Labelle, A. L., Joslyn, S., Fan, T. M., & Marshall, K. 2019. Evaluating the clinical and physiological effects of long-term ultraviolet B radiation on rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 28, 43-55.
- Winnepenninckx, E. (2020). Effect of housing on the health of pet rabbits. Masterproef Universiteit Gent, Faculteit diergeneeskunde. Online te raadplegen via https://lib.ugent.be/catalog/rug01_2838024.

Siçanlarda ve Farelerde Yaşam Alanı Kriterleri

Habitat Criteria in Rats and Mice

Sümeyye BAYSAL¹ 
Emre EREN¹ 
Kerim Emre YANAR¹ 

¹Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye



ÖZ

Siçan ve fareler bilimsel çalışmalarda yaygın olarak kullanılan laboratuvar hayvanlarıdır. Siçan ve farelerin bulundurulduğu ortam hayvanların yaşam alanı kriterlerine uygun olmalıdır. Hayvan sağlığı ve refahının sağlanamaması durumunda bilimsel çalışmalar etkilenir ve yanlış sonuçlar elde edilir. Yaşam alanı kriterlerinin ilk basamağı tesis tasarımıdır. Tesis siçan ve fareler için uygun olacak şekilde tasarlanmalıdır. Siçan ve farelerin bulundurulduğu odalar Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'nun yönergelerine uygun olacak şekilde düzenlenmelidir. Oda içine yerleştirilecek kafesler çalışma amacına göre belirlenmekle birlikte kolay temizlenebilir, kaçmaya karşı korumalı olmalıdır. Çalışma için gerekli olmadığı sürece tel kafesler yerine katı tabanlı olan kafesler tercih edilmelidir. Kafes boyutları hayvan popülasyonuna göre belirlenmelidir. Sıcaklık, nem, hava hareketi, aydınlatma, sanitasyon ve gürültü, yem, su ve altlık araştırma sonuçlarını etkileyen çevresel faktörlerdir. Siçan ve farelerin bulunduğu ortam fizyolojilerine uygun sıcaklık ve nem derecesinde olmalı, etkili bir havalandırma ve uygun bir fotoperiyod döngüsü sağlanmalı ve gürültüden uzak olmalıdır. Ayrıca sağlığa elverişli koşulların sürdürülmesi ve dezenfeksiyon için etkili bir sanitasyon belirlenmelidir. Yem, su ve altlık materyali de hayvan refahını etkileyen önemli çevresel faktörlerdir. Yem, fare ve siçan ihtiyacına göre belirlenmeli, temiz su sağlanmalı ve en uygun altlık malzemesi kullanılmalıdır. Laboratuvar hayvanlarıyla ilgili yapılan çalışmalarda, çalışma sonucunu etkileyebilecek bütün faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Yaşam alanı kriterleri de bu faktörler arasındadır. Yapılan çalışmalardan doğru sonuç alınabilmesi için laboratuvar hayvanlarının yaşam alanı kriterlerine dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu derlemenin amacı fare ve siçanlarda olması gereken yaşam alanı kriterlerinden bahsetmektir.

Anahtar Kelimeler: Fare, Refah, Siçan, Yem.

ABSTRACT

Rats and mice are laboratory animals commonly used in scientific studies. The environment in which rats and mice are kept must comply with the criteria for the habitat of the animals. If animal health and welfare are not ensured, scientific studies are affected and false results are obtained. The first step of the living space criteria is facility design. The facility should be designed to be suitable for rats and mice. The rooms where rats and mice are kept should be arranged in accordance with the guidelines of the Laboratory Animal Care and Use Guide. Although the cages to be placed in the room are determined according to the working purpose, they should be easy to clean and protected against escape. Unless necessary for the study, cages with solid bases should be preferred instead of wire cages. Cage sizes should be determined according to the animal population. Temperature, humidity, air movement, lighting, sanitation and noise, feed water and litter are environmental factors that affect research results. The environment where rats and mice are located should be at a temperature and humidity level suitable for their physiology. An effective ventilation and a suitable photoperiod cycle should be provided and it should be away from noise. In addition, an effective sanitation be determined for the maintenance of sanitary conditions and disinfection. Feed, water and litter material are also important environmental factors affecting animal welfare. Feed be determined according to the needs of mice and rats, clean water should be provided and the most suitable litter material should be used. In studies on laboratory animals, all factors that may affect the results of the study should be considered. Living space criteria are among these factors. In order to get accurate results from the studies, it is necessary to pay attention to the living space criteria of laboratory animals. The purpose of this review is to talk about the habitat criteria that should be in mice and rats.

Keywords: Food, Mice, Rats, Welfare.

Geliş Tarihi/Received 04.01.2023
Kabul Tarihi/Accepted 04.07.2023
Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author: Emre EREN

E-mail: emreeren@atauni.edu.tr

Cite this article: Baysal S, Eren E, Yanar K.E. (2024). Habitat Criteria in Rats and Mice. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(1), 8-14.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Genetik olarak manipüle edilmiş kemirgenlerin, in vivo gen işlevi ve regülasyonu, memeli gelişimi ve biyolojisi, insan hastalığı modellerinin geliştirilmesi ve gen terapisi çalışma modelleri dahil olmak üzere çok çeşitli bilimsel araştırmalar için yararlı olduğu gösterilmektedir (Hamilton ve Frankel 2001; Izraeli ve Rechavi 2002). Bu durum birçok araştırma kurumunda kemirgen popülasyonunda patlamaya yol açmaktadır (Faith ve ark., 2020). Gen hedefleme ve transgenik hayvanlar yaratma yeteneği de dahil olmak üzere ratın genetik manipülasyonunda son yenilikler, fareden daha arzu edilen bir model haline getirmektedir (Phillips ve ark., 2013; Homberg ve ark., 2017). Hayvan bakımı ve kullanımı için farklı standartlar genellikle hayvan temelli çalışma sonuçlarının karşılaştırılmasına ve sonuçların kurumlar arasında yeniden üretilmesine engel olacağı ve uluslararası bilimsel iş birliğini de engelleyebileceği için 1990'ların sonunda laboratuvar hayvanlarında standardizasyon ilgi konusu olmuştur (Demers ve ark., 2006; Faith ve ark., 2020). Bu standardizasyon genel değişkenliği ve hayvanların bakım ve kullanım biçimlerindeki genel değişkenliği en aza indirmek için yapılmıştır (Faith ve ark., 2020). Hayvan bakımı ve kullanımının uyumlu hale getirilmesinde önemli ilerleme kaydedilmiş olunmasına rağmen, hala yapılması gereken iyileştirmeler bulunmaktadır (Bailoo ve ark., 2014; Drucker, 2016). Fare ve ratların barındırılacağı odalar, Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu'nun (Ulusal Araştırma Konseyi, 2011) yönergelerine uygun olması gerekmektedir (Otto ve ark., 2015). Hayvan araştırmalarında yer alan bireylerin, hayvanların refahını koruma ve rahatsızlığı en aza indirme yükümlülüğü bulunmaktadır (Faith ve ark., 2020). Bu yükümlülük genellikle hayvan ve deneysel sonuç için faydalı olmaktadır (Baumans, 2005). Hayvan sağlığını ve refahını etkileyen faktörler arasında tesis ve oda tasarımı, kafes tasarımı ve inşaat malzemeleri, mevcut yaşam alanı ve hava değişimi ve hava kalitesi (bağıl nem, NH₃, CO₂, toz), sıcaklık, ışık ve gürültü seviyesi, altlık malzemesi, yiyecek ve su gibi çevresel faktörler yer almaktadır (Baumans, 2005; Faith ve Huerkamp, 2009).

Tesis Tasarımı

Hayvan araştırma tesisinin tasarımı, inşası ve bakımı, laboratuvar hayvanlarının yetiştirilmesinin türü ve kalitesinde önemli bir rol oynamaktadır (Faith ve ark., 2020). Hayvan araştırma tesisinde karantina, kafes yıkama ve sanitasyon, diyet saklama ve hazırlama, malzeme ve ekipman depolama, atık bertarafı, personel dolapları, duşlar, lavabolar, tuvaletler ve dinlenme odaları, özel

laboratuvarlar (cerrahi, otopsi, teşhis prosedürleri, görüntüleme, bulaşıcı hastalık ve biyolojik tehlike önleme, idari faaliyetler ve eğitim faaliyetleri yapılabilecek alanlar, yapılması gereken tüm araştırma manipülasyonlarına izin vermek için yeterli sayıda hayvan prosedür odası bulunması gerekmektedir (Hessler ve ark., 1999; Faith ve ark., 2020). Hayvan odaları, yetiştirme ve araştırma personelinin kolayca erişebileceği, ancak kafes yıkama tesisleri veya yoğun trafik alanları gibi gürültülü alanlardan uzak veya fiziksel yollarla izole edilmiş alanlara yerleştirilmesi gerekmektedir (Faith ve ark., 2020). Duvar, tavan ve zemin yüzeyleri, etkili sanitasyona izin veren, mikrobiyal dekontaminasyonu kolaylaştıran ve ekipmanın normal kullanımından ve manipülasyonundan kaynaklanan hasarlara karşı dirençli malzemelerden yapılması gerekmektedir (Otto ve ark., 2015). Hayvan odaları, odadaki otomatik zamanlayıcılar veya tercihen merkezi bir bilgisayarlı sistem tarafından kontrol edilen aydınlatma armatürleri tarafından sağlanan ışıkla penceresiz olması gerekmektedir (Faith ve ark., 2020).

Oda Düzeni

Tesisin ve hayvan odasının olabildiğince esnek olacak şekilde tasarlanması önem arz etmektedir (Faith ve ark., 2020). Hayvan refahını sağlamak için oda ortamının iyi kontrol edilmesi gerekmektedir (Otto ve ark., 2015). Oldukça benzer ayak izlerine sahip fare ve rat rafları artık her iki türün de barınması için eşit derecede uygun oda tasarımına olanak tanımaktadır (Faith ve ark., 2020). Enfeksiyöz hastalıkların önlenmesi ve kontrolü, kısmen fare barınak odasının konumu, boyutu ve çevresel koşullarının bir fonksiyonudur. (Otto ve ark., 2015). Gürültünün yarattığı stres nedeniyle, fare odaları mekanik odalardan, kafes yıkama merkezlerinden ve gürültü çıkarmaya yatkın türlerden uzağa yerleştirilmelidir (Council, 2011).

Kafesler

Araştırma fareleri kullanılarak üretilen verilerin kalitesi, araştırma tesisinde aldıkları barınak ve bakımın kalitesiyle ilişkilidir (Faith ve ark., 2020). İster grup ister bireysel olarak barındırılan fare ve ratlar için gereken kafes alanı miktarı, hayvanın/hayvanların spesifik fizyolojik veya protokol gerekliliklerinin yanı sıra hayvan ağırlığının, yaşının ve cinsiyetinin bir fonksiyonudur (Council, 2011). Kemirgenler için uygun kafesler, kaçmaya karşı korumalı ve kolay temizlenebilir olmalıdır. Evcil kemirgenlerin bakımında kafesin sık sık temizlenmesi çok önemlidir. Kafesin temizlenmemesi amonyak birikmesine neden olarak strese ve hastalığa yol açmaktadır (Frohlich, 2020). Kemirgenler

geleneksel olarak ya katı tabanlı ya da tel tabanlı kafeslerde barındırılmaktadır. Katı tabanlı kafesler genellikle ayakkabı kutusu kafesleri olarak adlandırılmaktadır. Çoğunlukla plastik veya metalden yapılmış, kenarları ve tabanı sağlam olan dikdörtgen kutulardır. Hayvanların kafes içinde daha iyi görülebilmeleri, ısı yalıtımı, ekonomi, dikişsiz yapıları, dayanıklılıkları ve kimyasal yapıları nedeniyle plastik kafesler genellikle metal kafeslere göre daha çok tercih edilmektedir (Faith ve ark., 2020). Bu kafesler için en sık kullanılan malzemeler polikarbonat ve polipropilendir (Otto ve ark., 2015). Kemirgenleri kafeslemek için seçilen plastikler, buhara ve kimyasallara dayanıklı olmalı ve tekrarlanan temizlikten sonra da sağlamlığını ve berraklığını korumalıdır. Genel olarak, ayakkabı kutusu kafesleri, yaklaşık 5 ft uzunluğunda ve 5-6 ft yüksekliğinde mobil raflara, çok sayıda metal levha veya tel çubuk yapı rafı ile yerleştirilmektedir (Faith ve ark., 2020). Tel tabanlı kafesler genellikle tamamen metalden yapılmakta ancak kenarları tel zeminli plastik olabilmektedir (Faith ve ark., 2020). Bu tür kafesler, dışkı ve idrarın zeminden aşağıdaki emici malzeme üzerine düşmesine olanak sağlamaktadır. Ayrıca temizlik kolaylığı için dışarı kaydırılan veya çıkarması kolay alt kısımlarının olması, altlıkları tutmak için yüksek kenarlı alt kısımlarının olması, oda ve kafes arasında yeterli havalandırma sağlanması, hayvanları manipüle etmeden kolay erişim sağlanması için büyük kapılarının olması ve her kafes açıklığı için güvenli bir kilitleme mekanizmasının olması gibi avantajları bulunmaktadır (Frohlich, 2020). Ratların tel tabanlı kafeslerde barındırılabilmesinin bir nedeni de kaprofaji önlemektir. Tel tabanlı kafesler yavru büyütme için uygun görülmemektedir (Faith ve ark., 2020). Birçok kemirgen, ekonomik ve deneysel nedenlerle farmasötik ve sözleşmeli toksikoloji laboratuvarlarında tel tabanlı kafeslerde barındırılmaktadır (Starke ve Oaks, 2001). Ancak deneysel bir ihtiyaç olmadıkça, kemirgenler tel tabanlı kafesler yerine sağlam tabanlı kafeslerde barındırılması gerekmektedir. Bu, daha sık olarak tel zeminlerle ilişkilendirilen podo-dermatit ve yaralanmaların önlenmesine yardımcı olmaktadır (Otto ve ark., 2015). Yapılan bir çalışmada, ayak lezyonlarının tel kafeslerde barındırılan ratlarda katı tabanlı kafeslerde barındırılan ratlara göre daha yaygın olduğu gösterilmiştir (Peace ve ark., 2001). Yapılan araştırmalarda, kemirgenlerin özellikle uzun süreli çalışmalar için, mümkün olduğunca altlıklı ve sağlam tabanlı kafeslerde barındırılması gerektiği bildirilmiştir (Faith ve ark., 2020). Kafes alanının barındırılan hayvan sayısına göre belirlenmesi gerekmektedir. Gruplar halinde barındırılan farelerde yaygın olarak önerilen minimum alan 10 gramdan küçük olan farelerde 6 (38,7)

zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 15 grama kadar olan farelerde 8 (51.6) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 25 grama kadar olan farelerde 12 (77.4) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 25 gramdan büyük olan farelerde ≥ 15 (≥ 96.7) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²)' dir. Kafes yüksekliği ise 5 (12.7) inç (cm)'dir. Yavrularıyla birlikte bulunan dişi fareler için önerilen minimum alan 51 (330) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²)'dir. Bununla birlikte diğer yetiştirme konfigürasyonları daha fazla alan gerektirebilir alan yetişkin ve yavru sayısı ile yavruların boyutu ve yaşı gibi hususlara bağlı olarak ayarlanabilmektedir. Ratlarda ise önerilen minimum alan 100 gramdan küçük olanlarda 17 (109.6) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 200 grama kadar olanlarda 23 (148.35) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 300 grama kadar olanlarda 29 (187.05) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 400 grama kadar olanlarda 40 (258) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 500 grama kadar olanlarda 60 (387) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²), 500 gramdan daha büyük olanlarda ≥ 70 (≥ 451.5) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²)' dir. Kafes yüksekliği 7 (17.8) yükseklik, inç (cm)' dir. Yavrularıyla birlikte bulunan dişi ratlar için önerilen minimum alan 124 (800) zemin alanı/hayvan, inç² (cm²)'dir. Hem fare hem ratlarda daha büyük hayvanlar, performans standartlarını karşılamak için daha fazla alana ihtiyaç duyabilmektedir (Council, 2011).

Çevresel Faktörler

Araştırma için kullanılan hayvanlar, deneysel parametrelere mümkün olduğunca büyük bir yanıtın standartlaştırılmasına izin veren koşullar altında tutulmalıdır. Yıllar boyunca, birçok çevresel faktörün araştırma sonuçlarını etkileyebileceğini gösteren birçok kanıt bulunmaktadır. Sıcaklık, nem, hava hareketi, aydınlatma, sanitasyon, gürültü, yem, su ve altlık son derece önemli çevresel değişkenlerdir (Faith ve ark., 2020).

Sıcaklık ve Nem

Isı, canlı organizmaları etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biridir (Faith ve ark., 2020). Hayvanlar minimum stres ve fizyolojik değişikliklerle uyum sağlayabilecekleri, türlerine uygun sıcaklık ve nem aralıklarında barındırılmalıdır (Council, 2011). Fare ve ratlarda oda için en uygun sıcaklık aralığının 20-26C (68-79F) olduğu belirtilmektedir (Council, 2011; Faith ve ark., 2020). Sıcaklıklar bu aralıkların ortasına yakın minimum dalgalanma ile seçilerek korunması gerekmektedir (Council, 2011).

Nem, kafesler içinde barındırılan hayvanlar için büyük önem taşımaktadır (Council, 2011). Aşırı yüksek veya düşük nem, araştırma hayvanları üzerinde olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Faith ve ark., 2020). Fare ve ratlarda %30–70 bağıl neme sahip odalar uygun kabul edilebilmektedir. Hayvan odalarına yerleştirilmiş veya elektronik çevre yönetim sisteminin bir parçası olarak yirmi dört saatlik sıcaklık/nem kaydediciler, çevre koşullarındaki değişiklikleri tespit etmektedir (Otto ve ark., 2015). Amonyak üretimini geciktirmek ve aynı zamanda ringtail lezyonlarını önlemeye çalışmak için, kemirgenler için bağıl nemin %40 ila %50 arasında tutulması gerekmektedir (Faith ve Huerkamp, 2009).

Havalandırma

Havalandırma yeterli bir oksijen kaynağı sağlamakta, hayvanlardan, personelden, ışıklardan ve ekipmanlardan kaynaklanan termal yükleri ortadan kaldırmakta, alerjenler ve havadaki patojenler dahil olmak üzere gaz halindeki ve partikül halindeki kirleticileri seyreltmekte, oda havasının nem içeriğini ve sıcaklığını ayarlamakta ve uygun olduğunda bitişik alanlar arasında hava basıncı farkları (yönlü hava akışı) oluşturmaktadır (Council, 2011). Tesis içindeki çeşitli alanların havalandırma oranları, temiz alanların kirli alanlara göre pozitif basınçta tutulmasını sağlayacak şekilde ayarlanmalıdır (Faith ve ark., 2020). Uzun yıllara dayanan uygulama, genel olarak, 10–15 hava değişimi/saat taze hava oranındaki havalandırma oranlarının, ısı yükünü ve hayvanlardan NH₃ ve CO₂ üretimini telafi etmek için yeterli olduğunu göstermektedir (Otto ve ark., 2015).

Aydınlatma

Işık, ortamın yaygın bir özelliğidir ve temel fizyolojik işlevlerden üst düzey bilişsel süreçlere kadar çok sayıda biyolojik süreci etkilemektedir (Warthen ve Provencio, 2012). Hayvan tutma odalarındaki ışık, günlük ve sirkadiyen döngülerin hem yeterli görüşü hem de nöroendokrin düzenlemesini sağlaması gerekmektedir (Council, 2011). Aydınlatma arızaları nadiren yaşamı tehdit eder, ancak bilim için en büyük tehlikeler arasında yer almaktadır. Fotoperiyottaki dalgalanmalar araştırmaları mahvedebilmektedir (Faith ve ark., 2020). Genel olarak aydınlatma, bir hayvan tutma alanı boyunca dağıtılmalı ve iyi bakım uygulamalarına, raflardaki en alttaki kafesler dahil olmak üzere yeterli hayvan denetimine ve güvenli çalışma koşullarına izin verirken hayvanların refahı için de yeterli aydınlık sağlamalıdır (Council, 2011). Fare ve ratlar için tipik olarak 12-14 saat aydınlık ve 10-12 saat karanlık olacak şekilde fotoperiyod döngüsü kullanılmaktadır (Otto ve ark., 2015). Kafes seviyesindeki ışık yoğunluğu ise 130 ila 325 lux

arasında olmalıdır (Council, 2011). Karanlık döngü sırasında 0,2 lux kadar az ışığa maruz kalma bile sirkadiyen ritimleri değiştirebilmektedir (Dauchy, 2010). Bu nedenle ışık döngüsünün karanlık fazında gerekmedikçe ışıklar yakılmamalıdır (Faith ve ark., 2020). İnsan meme kanseri implante edilmiş ratlarda yapılan bir çalışmada, karanlık döngüde loş ışığa maruz kalmanın melatonin baskılanmasına neden olduğu ve hiperglisemi ve hiperinsülinemiye yol açan birkaç önemli kanser önleyici sinyal mekanizması arasında düzenlenen konakçı/kanser dengesini bozduğu ve in vivo olarak tümör büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir (Blask ve ark., 2014). Kafesin yapıldığı malzeme, kafese en fazla ışığın girmesine izin veren şeffaf, yarı saydam ve renksiz olması gerekmektedir (Faith ve ark., 2020). Floresan ışık, güneş ışığından daha dar bir dalga boyu aralığı sağladığı için tam spektrumlu floresan ampullerin kullanılması, hayvan tesisinde daha doğal bir ışık ortamı sağlamanın alternatif bir yolunu oluşturmaktadır (Castelhano-Carlos ve Baumans, 2009).

Gürültü

Kemirgenlerin duyu sistemi, çeşitli genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (Faith ve ark., 2020). Gürültüye maruz kalmanın geniş duysal ve duysal olmayan sistemik etkileri bulunmaktadır. Bu etkiler nöroendokrin ve kardiyovasküler bozuklukları, uyku-uyanıklık döngüsü bozuklukları, nöbet duyarlılığı, üreme ve gelişme gerilikleri, bağışıklık işlev bozukluğu ve belirli ajanların bir dizi toksikolojik özelliklerindeki değişikliklerdir (Pascuan ve ark., 2014). Ratlar 100-70.000 Hz. aralığında fareler ise 500-120.000 Hz. aralığında duyabilmektedir. Hayvan tesislerinde normal arka plan gürültüsünü aşan desibel seviyeleri, çeşitli hayvan türlerinin duysal tüylerinin ve destek hücrelerinin çeşitli derecelerde tahribatına neden olmaktadır. Rat ve fareler 160 dB'de mekanik hasar, yaklaşık 140 dB'de ağrı ve yaklaşık 100 dB'ye uzun süre maruz kaldıktan sonra iç kulak hasarı belirtileri yaşamaktadır (Faith ve ark., 2020). Yapılan bir çalışmada ultrasonik hareket sensörlerinin yaydığı sesin genç veya duyarlı fare veya ratlarda odyojenik nöbetlere neden olabildiği ve hatta hayvanların birkaç dakika maruz kalması durumunda kalıcı işitme kaybına neden olabileceği gösterilmiştir (Turner, 2020). Hayvan barındırma ve çalışma alanlarının amacı, ortam gürültüsünün yaklaşık 55 dB' de tutulması ve özellikle 10-100 kHz frekanslarının karşılaşılabileceği yerlerde sesin azaltılması için önlemler alınması olmalıdır (Faith ve ark., 2020).

Sanitasyon

Sanitasyon, sağlığa elverişli çevresel koşulların sürdürülmesi anlamına gelmekte ve altlık değişimi, temizlik ve dezenfeksiyonu içermektedir. Sanitasyon yöntemleri ve sıklığı, hayvanların normal fizyolojik ve davranışsal özellikleri, kafesin tipi, fiziksel özellikleri ve boyutu, hayvanların türü, sayısı, boyutu, yaşı ve üreme durumu, altlık malzemelerinin kullanımı ve türü, sıcaklık ve bağıl nem ve kafesin yüzeylerinin kirlenme oranına göre belirlenmelidir (Council, 2011). Kılavuza göre genel olarak kafesler ve aksesuarlar en az 2 haftada bir sterilize edilmesi gerekmektedir. Katı tabanlı kafesler, şişeler ve su tüpleri haftada 1-2 kez dezenfekte edilmesi gerekmektedir (Faith ve ark., 2020). Kafes yoğunluğu çok düşükse veya havalandırılmalı kafesler kullanılıyorsa daha az sıklıkta, kafes yoğunluğu yüksekse veya altlığın kirlenme oranını artıran patofizyolojik durumlar (ör. diyabet) varsa daha çok sıklıkta temizlenmesi gerekmektedir (Otto ve ark., 2015). Etkili dezenfeksiyon 143-180°F veya daha yüksek sıcaklıktaki yıkama ve durulama suyuyla elde edilebilmektedir (Council, 2011).

Yem, Su ve Altlık

Kemirgen kolonilerinin refahını etkileyen en önemli çevresel faktörlerden biri, yeterli beslenmeyi sağlayan bir diyet erişimdir (Faith ve ark., 2020). Hayvanlar gruplar halinde barındırıldığında, özellikle protokol veya yönetim rutininin bir parçası olarak yem kısıtlanmışsa, yiyecek için rekabeti en aza indirmek ve tüm hayvanların yiyeceğe erişimini sağlamak için yeterli alan ve yeterli besleme noktası olması gerekmektedir (Council, 2011). Farelerde ve ratlarda protein gereksinimleri %14 ila %16'dır ve formüle edilmiş diyetlerin bu gereksinimleri yansıması gerekmektedir (Frohlich, 2020). Doğal içerikli diyetlerin 21°C'nin (70°F) altında ve %50 bağıl nemin altında saklanması önerilmektedir. Uygun şekilde saklanan doğal içerikli, kuru laboratuvar hayvanı yemlerinin çoğu, üretimden sonra 6 aya kadar kullanılabilir. Saflaştırılmış ve kimyasal olarak tanımlanmış diyetler genellikle doğal içerikli diyetlerden daha az karardır. Raf ömürleri genellikle 6 aydan azdır. 4°C (39°F) veya daha düşük sıcaklıklarda saklanabilmektedir (Council, 2011).

Su, araştırmaları derinden etkileyebilecek bir değişkendir. Deneyler üzerindeki olumsuz etkiyi en aza indirmek için, hayvan kaynakları programında kullanılan su taze, içilebilir ve kirlenmemiş olması gerekmektedir (Faith ve ark., 2020). Özellikle belirli bir bölgedeki normal su bileşenlerinin, çalışma sonuçlarını etkileyebileceği için,

kullanılan su kalitesinin kabul edilebilir olduğundan emin olmak için pH, sertlik ve mikrobiyal veya kimyasal kontaminasyon açısından periyodik izleme gerekmektedir (Council, 2011). Musluk veya arıtılmış içme suyunun hiperklorasyonu (12-15 ppm) veya asitleştirilmesi (pH 2-2,5), tek başına veya her ikisinin kombinasyonu, endojen, fırsatçı mikrofloranın kemirgenlerde özellikle gram-negatif bakterilerin baskılanması için 40 yılı aşkın bir süredir savunulmaktadır (Faith ve ark., 2020).

Altlık ve yuvalama malzemeleri deneysel verileri etkileyebilen ve hayvan refahını iyileştirebilen kontrol edilebilir çevresel faktörlerdir (Council, 2011). Altlık malzemelerinin iyi performans göstermesi için yüksek nem emme kapasitesine sahip olması, NH₃ bağlama kapasitesinin yüksek olması, yabancı kemirgenlerin dışkısı, koruyucular patojenik ajanlar ve böcek ilaçları içermemesi gerekmektedir. Ayrıca mümkün olduğunca tozsuz, ekonomik ve atılması uygun olmalıdır (Faith ve ark., 2020). Altlık seçenekleri arasında geri dönüştürülmüş kâğıt, mısır koçanı, çam ve çeşitli sert ağaçlar gibi talaşlar bulunmaktadır (Frohlich, 2020). Öğütülmüş mısır koçanı, kemirgen yatak malzemesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yaygın kullanımının birincil nedeni, kafes değişimleri arasında daha uzun süreler izin veren ve dolayısıyla işçilik maliyetinde bir azalma sağlayan amonyak oluşumuna direnme kabiliyetidir. Mısır koçanı altlıkları, üreme çalışmalarında veya üreme hormonlarının deneysel sonuçlarda rol oynadığı çalışmalarda yer alan fareler için kullanılmamalıdır (Faith ve ark., 2020). Yaygın olarak kullanılan dört yatak malzemeleri (mısır koçanı, geri kazanılmış odun talaşı, kavak talaşı ve geri dönüştürülmüş kâğıt), amonyak seviyelerini kontrol etme yetenekleri açısından karşılaştırıldığında mısır koçanı, kavak talaşı ve geri dönüştürülmüş kâğıt altlıkların amonyak seviyelerini kabul edilebilir şekilde kontrol ettiğini geri kazanılmış odun talaşının ise amonyak seviyelerini yeterince kontrol edemediğini ve bu yatak üzerinde barındırılan farelerin burun deliklerinde 1 hafta içinde patolojik değişiklikler meydana geldiğini göstermektedir (Ferrecchia ve ark., 2014). Rat ve fareler büyük lifli parçacıklardan oluşan altlık malzemelerini tercih etmekte ve tercih testlerinde genellikle küçük parçacıklardan (<1,2- 1,6 mm²) kaçınmaktadırlar (Faith ve ark., 2020).

Sonuç

Araştırma hayvanları, çevrelerindeki birçok faktöre veya değişikliğe tepki vermektedir. Bu tepkiler deneysel sonuçları etkileyebilmektedir. Çevresel unsurların biyolojik süreçler üzerindeki etkileri ne kadar iyi anlaşılırsa,

değişkenler o kadar iyi kontrol edilebilmektedir. Tüm çevresel değişkenlerin etkin kontrolü her zaman imkansızdır. Ancak çalışma sonuçlarına müdahale etme olasılığı yüksek olan çevresel faktörleri kontrol etmek için tüm makul girişimlerde bulunulmalıdır. Laboratuvar hayvanlarının bilimi ve tıbbının ana kuralı, sağlık ve yetiştirme programlarında yürütülen prosedürlerin araştırma sonuçları üzerinde önemli etkiye sahip olabileceğini her zaman akılda tutmaktır.

Yazar Katkıları: Fikir- S.B, E.E. K.E.Y; Tasarım- S.B.; Denetleme- K.E.Y.; Kaynaklar- E.E.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi S.B.; Analiz ve/ veya Yorum- K.E.Y.; Literatür Taraması- S.B., E.E.; Yazıyı Yazan- E.E.; Eleştirel İnceleme- K.E.Y.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Author Contributions: Concept - S.B, E.E. K.E.Y; Design- S.B.; Supervision- K.E.Y; Resources-E.E.; Data Collection and/or Processing- S.B.; Analysis and/or Interpretation- K.E.Y.; Literature Search- S.B., E.E.; Writing Manuscript- E.E.; Critical Review- K.E.Y.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

- Bailoo, J. D., Reichlin, T. S., Wuerbel, H. (2014). Refinement of experimental design and conduct in laboratory animal research. *ILAR journal*, 55(3), 383-391. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu037>
- Baumans V. (2005). Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 24(2), 503-513.
- Blask, D. E., Dauchy, R. T., Dauchy, E. M., Mao, L., Hill, S. M., Greene, M. W., Belancio, V. P., Sauer, L. A., & Davidson, L. (2014). Light exposure at night disrupts host/cancer circadian regulatory dynamics: impact on the Warburg effect, lipid signaling and tumor growth prevention. *PloS one*, 9(8), e102776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102776>
- Castelhano-Carlos, M. J., & Baumans, V. (2009). The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats. *Laboratory animals*, 43(4), 311-327. <https://doi.org/10.1258/la.2009.0080098>
- Council, N. R. (2011). Guide fo the Care and Use of Laboratory Animals: Eight Edition. *Tha National Academies Press, Washington, DC.* [Google Scholar].
- Dauchy, R. T., Dauchy, E. M., Tirrell, R. P., Hill, C. R.,

- Davidson, L. K., Greene, M. W., Tirrell, P. C., Wu, J., Sauer, L. A., & Blask, D. E. (2010). Dark-phase light contamination disrupts circadian rhythms in plasma measures of endocrine physiology and metabolism in rats. *Comparative medicine*, 60(5), 348-356.
- Demers, G., Griffin, G., De Vroey, G., Haywood, J. R., Zurlo, J., & Bédard, M. (2006). Animal research. Harmonization of animal care and use guidance. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5774), 700-701. <https://doi.org/10.1126/science.1124036>
- Drucker D. J. (2016). Never Waste a Good Crisis: Confronting Reproducibility in Translational Research. *Cell metabolism*, 24(3), 348-360. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.08.006>
- Faith, R. E., & Huerkamp, M. J. (2009). Environmental considerations for research animals. *Planning and designing research animal facilities*, 59-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369517-8.00007-4>
- Faith, R. E., Allen, K. P., & Hessler, J. R. (2020). Housing and environment. *The laboratory rat*, 349-417. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814338-4.00010-6>
- Ferrecchia, C. E., Jensen, K., & Van Andel, R. (2014). Intracage ammonia levels in static and individually ventilated cages housing C57BL/6 mice on 4 bedding substrates. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 53(2), 146-151.
- Frohlich, J. (2020). Rats and mice. *Ferrets, rabbits, and rodents*, 345. <https://doi.org/10.1016%2FB978-0-323-48435-0.00025-3>
- Hamilton, B. A., & Frankel, W. N. (2001). Of mice and genome sequence. *Cell*, 107(1), 13-16. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00514-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00514-1)
- Hessler, J. R., Broderson, R., & King, C. (1999). Animal research facilities and equipment. *Anthology of Biosafety*, 1, 191-217.
- Homberg, J. R., Wöhr, M., & Alenina, N. (2017). Comeback of the Rat in Biomedical Research. *ACS chemical neuroscience*, 8(5), 900-903. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.6b00415>
- Izraeli, S., & Rechavi, G. (2002). Molecular medicine--an overview. *The Israel Medical Association journal: IMAJ*, 4(8), 638-640.
- Otto, G. M., Franklin, C. L., & Clifford, C. B. (2015). Biology and diseases of rats. In *Laboratory animal medicine* (pp. 151-207). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409527-4.00004-3>
- Pascuan, C. G., Uran, S. L., Gonzalez-Murano, M. R., Wald, M. R., Guelman, L. R., & Genaro, A. M. (2014). Immune alterations induced by chronic noise exposure: comparison with restraint stress in BALB/c and C57Bl/6 mice. *Journal of immunotoxicology*, 11(1), 78-83.

- <https://doi.org/10.3109/1547691X.2013.800171>
- Peace, T. A., Singer, A. W., Niemuth, N. A., & Shaw, M. E. (2001). Effects of caging type and animal source on the development of foot lesions in Sprague Dawley rats (*Rattus norvegicus*). *Contemporary topics in laboratory animal science*, 40(5), 17–21.
- Phillips, J., Hogan, A., & Erin, L. (2013). Animals in research: rats. In *Conversation* (Vol. 16634, pp. 1-4).
- Starke, W. A., & Oaks, J. A. (2001). Ileal mucosal mast cell, eosinophil, and goblet cell populations during *Hymenolepis diminuta* infection of the rat. *Journal of Parasitology*, 87(5), 1222-1225. [https://doi.org/10.1645/00223395\(2001\)087\[1222:IMMCEA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/00223395(2001)087[1222:IMMCEA]2.0.CO;2)
- Recommendations for Developing a Measurement Plan. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science: JAALAS*, 59(6), 665–672. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-19-000131>
- Warthen, D. M., & Provencio, I. (2012). The role of intrinsically photosensitive retinal ganglion cells in nonimage-forming responses to light. *Eye and brain*, 4, 43–48. <https://doi.org/10.2147/EB.S27839>

Turner J. G. (2020). Noise and Vibration in the Vivarium:

Examining the Effects of Oxygen Exposure on the Developing Brain Through Murine Models

Yenidoğan Rodent Modellerinde Hiperoksik Beyin Hasarının Değerlendirilmesi

Canberk Yılmaz¹

Defne Engür¹

Abdullah Kumral²

Osman Yılmaz³



¹Department of Pediatrics, Izmir Faculty of Medicine, University of Health Sciences, Izmir, Turkey

²Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey

³Institute of Health Sciences, Department of Laboratory Animal Science, Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey



Geliş Tarihi/Received 24.04.2023

Kabul Tarihi/Accepted 17.01.2024

Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Osman Yılmaz

E-mail: osman.yilmaz@deu.edu.tr

Cite this article: Yılmaz C., Engür D., Kumral A., & Yılmaz O. (2024). Examining the Effects of Oxygen Exposure on the Developing Brain Through Murine Models. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(1), 15-25.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

ABSTRACT

Hyperoxia is one of the key players contributing preterm brain injury. Researchers typically use rodent models to pinpoint the underlying pathologic alterations in hyperoxic brain damage. When evaluating the neurological effects of neonatal hyperoxic brain injury in an experimental model, choosing the appropriate assessment techniques is crucial. The goal of this article is to review the behavioral and learning tests that can be used to determine the impact of hyperoxia on the developing brain. Injuries to the nervous system can be recovered very quickly in newborn rodents. Thus, the timing of evaluation tests are very critical. A model that is appropriate for the brain's developmental processes and accurately simulates the damage in humans should be utilized in studies on neonatal hyperoxic brain injury, and the right test should be chosen at the appropriate time. In the first twenty days, physical and motor development tests, and subsequent evaluation of damaged brain structures are relevant. The open field and forced swim tests can be used to assess the animal's locomotor activity and depressive condition, while the watermaze, passive avoidance and new object recognition tests can be used to assess cognitive abilities. In laboratory mice and rats, physical development and motor reflex development tests can be started right after birth, while learning and memory tests can be done from 4 weeks at the earliest. Correlations between motor development, behavior, memory tests, and results of cellular/ molecular studies should be made and interpreted carefully.

Keywords: Brain injury, behavioral test, hyperoxia model, motor development tests, newborn rodent

Öz

Hiperoksi, preterm beyin hasarına katkıda bulunan önemli postnatal faktörlerden biridir. Hiperoksinin neden preterm beyin dokusunda yol açtığı olduğu patolojik süreçlerin aydınlatılabilmesi için deneysel kemirgen modelleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu derleme, yenidoğan hiperoksik beyin hasarının değerlendirmesinde, araştırmacıların davranış ve öğrenme testleri ile ilgili seçimlerine ışık tutmayı hedeflemektedir. Yenidoğan kemirgen modellerinde, hayvanların nörolojik hasarlarından hızla iyileşme konusunda yüksek yeteneğe sahip olduğu göz ardı edilmemelidir ve değerlendirme testlerinin yapılma zamanı iyi belirlenmelidir. Beynin gelişimsel süreçlerine uygun, insanlardaki hasarı daha iyi yansıtacak hayvan modeli kullanılmalı, doğru değerlendirme testi seçilmeli ve seçilen testler doğru zamanda uygulanmalıdır. Yaşamın ilk yirmi gününde fiziksel ve motor gelişim testleri kullanılmalı, daha sonraki süreçte beyin olgunlaşmasına paralel olarak davranış ve bellek testleri ile değerlendirilme yapılmalıdır. Lokomotor aktivite ve depresyon varlığı açısından açık alan testi, bilişsel işlevlerin değerlendirilmesi için yeni obje tanıma, su labirenti ve pasif kaçınma testleri seçilebilir. Motor gelişim, davranış ve bellek testleri, hücresel ve moleküler değişiklikler ile korele edilerek yorumlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Beyin hasarı, davranış testleri, hiperoksi modeli, motor gelişim testleri, yenidoğan rodent.

Introduction

Every year, around 15 million babies are delivered prematurely in the world (Chawanpaiboon et al., 2019). Although survival rates have improved significantly through scientific and technologic advances in perinatology and neonatology, these infants remain vulnerable to many complications in their future life due to immature organ systems at birth. One of the major organs that is adversely affected by preterm birth is the brain. Oxidative stress, arising from exposure to high oxygen levels (hyperoxia) is suggested to be one of the main contributing mechanisms causing brain injury in preterm babies (Reich et al., 2016). When compared to intrauterine life, preterm newborns are exposed to high oxygen levels after delivery, and the majority of them need supplementary oxygen for respiratory support. This situation results in the production of reactive oxygen species (ROS), which interferes with the critical processes in the developing brain (Saugstad et al. 2021). Although target saturation limits have been established and oxygen saturation is routinely monitored in intensive care units by pulse oximetry, premature newborns are still inevitably exposed to high levels of oxygen (Falsaperla et al., 2022). Despite the awareness of the possible detrimental effects of hyperoxia has grown dramatically over the past few decades, studies have demonstrated that preterm newborns frequently receive extra oxygen especially after hypoxic episodes brought on by apnea or bradycardia (van Zanten et al., 2014). Additionally, lung mechanics might vary, making it challenging to maintain a constant, stable target saturation range. ROS can be produced in excess even during brief periods of hyperoxia, which can cause oxidative stress and inflammation (Farrow et al., 2012). Furthermore, preterm newborns have an undeveloped antioxidant defense mechanism, making them particularly susceptible to hyperoxia. Both antioxidant enzymes and non-enzymatic antioxidant components have been reported to be lower in preterm infants than in term children (Perrone et al., 2017). Overall, this renders preterm newborns fundamentally unable to counterbalance a hyperoxic burden, leading to increased ROS generation that will surpass antioxidant capacity and might result in cellular damage. ROS can alter neural stem cell differentiation and interfere with developmental processes in the preterm brain (Micili et al., 2020). The most recent recommendations based on the available research suggest oxygen saturation objectives of 90-94% for optimum oxygenation of preterm infants during their stay in neonatal intensive care and designate levels above 95% as hyperoxia, which is linked to higher rates of mortality and morbidity (Andresen & Saugstad, 2020). In

the study, when the effects of hyperoxia on gender were compared, it was shown that female infants were less harmed than male infants by the harmful effects of high oxygen concentration (Deulofeut et al. 2007).

Murine Models of Neonatal Oxygen Exposure

The newborn mouse and rat models are extensively used as experimental models for hyperoxic brain injury in the literature. In this review, the terms "rodent" and "sub-sublines to these two species" refer to the species of mouse and rat, respectively. For experimental models of hyperoxia, the developmental stage of the brain at birth in mouse and rat pups provides a substantial advantage in mimicking the preterm human brain.

The formation of the neural tube, which is the first stage in the development of the central nervous system in all vertebrates, is where the spinal cord and brain emerge from the ectoderm. Compared to human gestation, which lasts 266–280 days, mouse and rat gestation lasts 20–21 days. Neural tube formation occurs at 10-11th gestational days in rats and 9-9.5 th days in mice (DeSesso et al., 1999; Rice & Barone, 2000). When comparing the cerebral development of experimental animals and humans, it is important to take into account the timing of behaviors associated with growth that overlap with neurogenesis, synaptogenesis, gliogenesis, oligodendrocyte maturation, and developmentally regulated molecular and biochemical alterations. Rodents and humans both go through important stages of brain development in a roughly comparable order. Regional sensitivity and functional outcomes following brain lesions also clearly show similarities (Semple et al., 2013).

Mammalian brain development is a dynamic process that includes structural and functional maturation processes. In brain development, many processes such as neuronal cell proliferation and differentiation, migration, glial cell proliferation, axonal and dendritic growth, synaptogenesis and myelination of axons occur sequentially or simultaneously (Stiles & Jernigan, 2010). On the developing rodent brain, hyperoxia stimulates cellular degeneration, causes hypomyelination, and results in long-term cognitive damage. It also causes gene alterations linked to oxidative stress, inflammation, neurodegeneration, apoptosis, autophagy, and synaptic plasticity (Brehmer et al., 2012; Gerstner et al., 2008; Serdar et al., 2016). In recent studies, it has been associated with hyperactivity and coordination deficits and cognitive

deficits. The brain areas affected are the cortex, basal ganglia, hypothalamus, striatum, hippocampus, and white matter structures.

Treatment of immature rats with high doses of oxygen from birth in the first five days of life results in a significant increase in apoptotic cells and a decrease in brain weight. Oxygen sensitivity varies depending on age. Resistance to the harmful effects of hyperoxia has been observed in rodents starting from postnatal PN14 (Felderhoff-Mueser et al., 2004). There are differences in oxygen exposure time and oxygen concentration practices in rodent neonatal hyperoxic brain injury model protocols. In studies reported in the literature, oxygen concentrations vary between 40%, 70% and 95%, and the induction period varies between 2-7 days. Since the first seven days after normal birth in rodents correspond to the immature lungs of premature babies in humans, hyperoxia administration should be completed during this period (Giusto et al. 2021). There is also gender dimension of oxygen exposure and ROS susceptibility. Aside from evident morphological and physiological variations between the male and female brain, recent evidence suggests sex dependant alterations in fundamental cellular and molecular process including apoptosis and cell death. Sexual dimorphism has also been shown in cytosolic and mitochondrial pathways. Differences in mitochondrial related pathways in male and female cells may explain the differing susceptibility to mitochondrial dysfunction following oxygen exposure, with female cells displaying stronger resilience to insults. Researchers should carefully evaluate and analyse their results with regards to the sex of the animals (Di Florio et al., 2020).

A closed cabin system with an oxygen supplying intake is employed for rodent hyperoxia applications, where the oxygen content is continuously measured (Figure 1). The pups are placed in this cabin with their mothers in their own cages.

Sodaline is used to keep the humidity that will occur during hyperoxia treatments below 80%, and the pellet feeds are changed once in 24 hours to prevent moisture (Kwak et al., 2006).

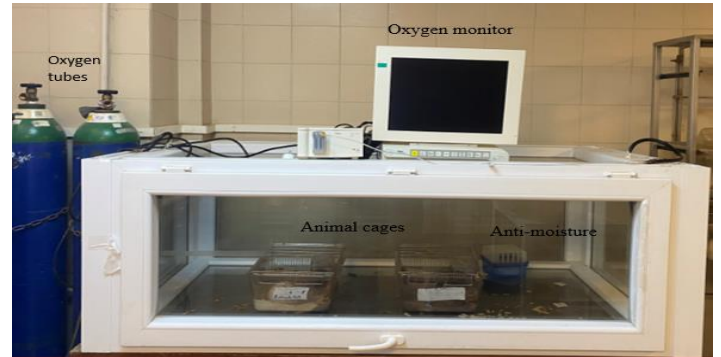


Figure 1. Mouse and Rat Neonatal Hyperoxia Cabinet

Şekil 1. Fare ve Sıçan Yenidoğan Hiperoksi Kabini

Evaluation in Hyperoxic Brain Injury Models

Following oxygen exposure, neonatal rodents suffer global damage to their developing brains. Because of this, it would be more suitable to conduct an early functional examination while taking the animal's physical growth into account. Using motor development tests during the first 20 days and behavioral and learning memory tests later on, in accordance with the maturation of the brain, may be a more accurate strategy (Eltokhi et al., 2020). In the rodent neonatal hyperoxia model, damage to the brain tissue occurs globally. For this reason, it would be more appropriate to carry out early functional evaluation by considering the physical development of the offspring. For the evaluation of the rodent hyperoxic brain injury model, it may be a more accurate approach to use motor developmental tests in the first twenty days and then behavioral and learning memory tests in accordance with brain maturation in the following period (Figure 2) (Eltokhi et al., 2020).

of myelination at PN10 is similar to that of human term infants (Tucker et al.). According to EEG data, PN1 in rats is equivalent to 23 weeks of gestation in humans, while PN7–10 is equivalent to 30–32 weeks. These factors make neonatal reflex tests on newborn rat pups suitable for evaluating brain development, ontogeny, and injury (Tucker et al., 2009).

Developmental motor tests in rodents were described for the first time in the literature by WM Fox and A. Lubics (Fox, 1965; Lubics et al., 2005). Newborn motor development tests are ambulation, hindlimb foot angle, stance correction, negative geotaxis, anterior and posterior limb suspension, grasp reflex, four-limb grip strength, and cliff avoidance tests. These tests are used to monitor the motor development of mouse and rat pups through PN2–14 (Feather-Schussler & Ferguson, 2016). These tests, which are used in the evaluation of neonatal brain damage, can also be used in the evaluation of functional deficiency in brain regions that are responsible for learning-memory-motor-sensory functions such as the hippocampus, amygdala, and cortex (sensory-motor) affected by hyperoxia. The motor reflex development times of mouse and rat pups are given in Figure 4.

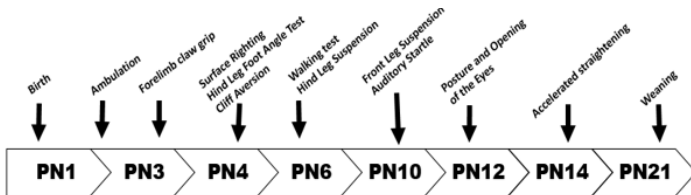


Figure 4. Time periods for the evaluation of neonatal motor function in mice and rats

Şekil 4. Fare ve Sıçan Yenidoğan Yavrularında Motor Fonksiyonunun Değerlendirilme Zamanları

1. Ambulation Test: In rodent pups with closed eyes, ambulation is the first form of locomotion that emerges. Since hyperoxia causes brain hypomyelination and cell death, its effect on crawling can be tested. Rodent pups start to crawl between PN 0–5 and walk between PN 5–10. Since there is no learning potential, this test can be repeated as needed throughout the experiment. During the test, the pup is placed in an open space where it can be seen from the sides and from above, and is motivated by gently touching the tail (Figure 5). Ambulation of puppies is scored for three minutes. In terms of scoring, 0 corresponds to no movement, 1 to asymmetrical limb ambulation, 2 to slow symmetrical ambulation, 3 to fast ambulation/walking (Balasubramaniam et al., 2005; Williams & Scott, 1954).



Figure 5. Ambulation

Şekil 5. Ambulasyon

2. Hind Leg Foot Angle Test: Placing the hind legs properly on the ground is important for walking function in newborn rodents. With this test, gait abnormalities are tested. As pups transition from crawling to walking, there is a marked developmental change in hind leg posture (Figure 6). In normal development, the hind legs are positioned under the body and the angle between the hind legs is less. Although the hind leg foot angle changes over time, mouse pups of the same age with different injuries or diseases can be compared. This test has no learning potential, so it can be repeated as needed throughout the experiment. Test duration is two minutes. Three to five measurements are made and the average angle is calculated for each pup tested (Feather-Schussler & Ferguson, 2016).

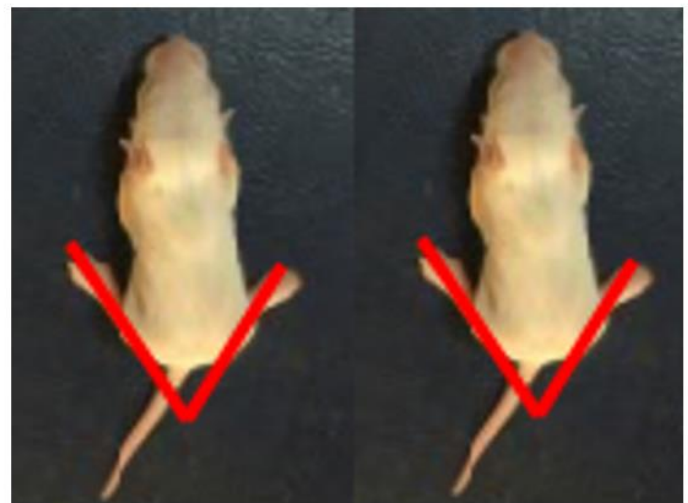


Figure 6. Hind leg angle test

Şekil 6. Arka ayak açısı testi

3. Surface Righting: Being able to stand up straight after turning from the supine posture and moving into the standard stance position is a crucial skill in the motor development of a pup. The righting reflex normally appears in rodents between PN1 and 10. It begins to form about PN5. Since this test is a reflex, there is no learning component and can be repeated throughout the experiment. Pups are placed on their backs on a cotton cloth and held in this position for five seconds (Figure 7). The time from pup release to emergence is recorded. A total of one minute is given for each trial. A total of three repetitions can be made.



Figure 7. Surface righting

Şekil 7. Yüzey düzeltme

4. Negative Geotaxis Test: In newborn rodents, vestibular functions allow movement on an inclined surface in the opposite direction of the slope against gravity. When puppies are placed upside down, they turn up thanks to their vestibular tips. This test, which evaluates motor coordination, can be done between PN3-15 (Figure 8). During practice, the pup is placed head down on a 45-degree incline and held for five seconds and then released. The elapsed time is recorded when the pup faces upwards. Total test time is two minutes. A total of three trials are repeated. Mice that fall off a slope or fail to turn may be retested, eliminated or given a zero score (Heyser, 2003).

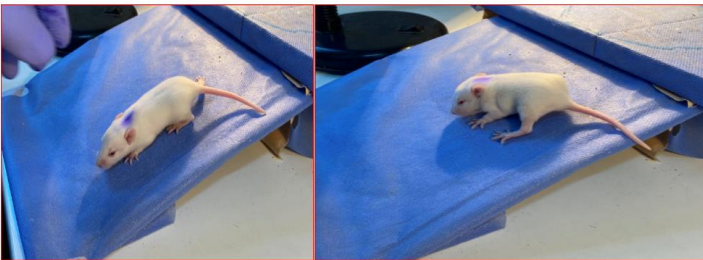


Figure 8. Negative geotaxis

Şekil 8. Negatif geotaxis

5. Front Limb Suspension: Front legs in newborn rodents are important in terms of functions such as grasping, holding and shredding. Testing foreleg strength, including

arm and paw strength, this test is not recommended for puppies smaller than PN10 (Corti et al., 2008; Grondard et al., 2005). Puppies are allowed to hold a wire stretched to a fixed object and hook it with both front paws (Figure 9). There is no learning and negative reinforcement in this test, which allows to detect right/left paw strength differences. It can be repeated three times in total.



Figure 9. Front Limb Suspension

Şekil 9. Ön uzuv süspansiyonu

6. Hindlimb Suspension: In newborn rodents, hind legs constitute the main thrust of the movement and are the main factor for walking. This test, which determines hind leg strength, is especially designed for newborns. This test, which can be applied between PN2-12, can detect right/left hind leg strength differences as well as neuromuscular function. For this test, a standard cylindrical tube with a volume of 50 ml filled with cotton is used. Similar to the front leg suspension test, this test can be learned, especially since there is no negative result from a fall (Figure 10). Therefore, increased non-joining, as seen with litters that drop as soon as they are released, or non-adherence when placed at the rim of the tube can be noted. The cub is released, the hind leg posture is observed, and the pup's posture is scored. The test is repeated three times (El-Khodor et al. 2008).



Figure 10. Rear leg Suspension

Şekil 10. Arka bacak süspansiyonu

7. Grip Strength: It is a test for grasping the front and hind legs together and carrying the weight of the whole body in newborn rodents and examines the strength of all four

paws at the same time (Figure 11). For the test, 16x18 cm fiberglass mesh is used. For a rodent to grasp a horizontal screen, it is made between PN5–15. The test starts from the standard horizontal position and first changes to 45°, 90° and 180° degrees. The pup is allowed to adapt to this environment for about five seconds. The wire platform is slowly turned to 180 degrees. The approximate angle of the screen is recorded when the pup falls. It is repeated for a total of three trials and the average of the trials is taken (Corti et al., 2008; Fox, 1965; Heyser, 2003; Venerosi et al., 2009).

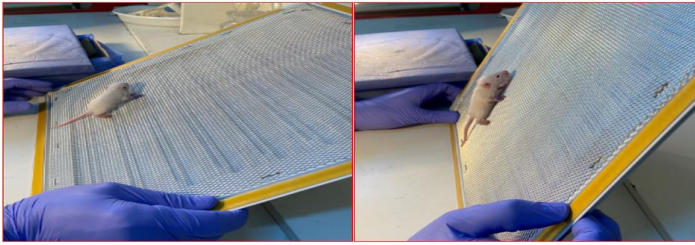


Figure 11. Grip Strength

Şekil 11. Kavrama gücü

8. Grasping Reflex: The front and hind claws of newborn rodents are tested one by one for grasping, holding, climbing and holding functions. The grasping reflex is usually performed between PN3-15, on the 7th day after birth on average (Figure 12). Each paw is tested individually. Since it is a reflex, this test can be repeated until the reflex appears. He is not inclined to learn. Each paw is tested separately. The presence or absence of coupling is recorded. 1 point is awarded for each paw grasped by the pup (Heyser, 2003).



Figure 12. Grasping Reflex

Şekil 12. Kavrama refleksi

9. Cliff Aversion: It is an important test that develops in newborn rodents while their eyes are closed (Figure 13). It can be used to test pups between PN1-14. The pup is placed on the flat raised ledge with the front paw and nose pointing out of the cliff. The pup is expected to move away from the cliff and remove its paws and nose from the edge.

The test is repeated for a total of three trials and is terminated if no response is received after a total of 30 seconds (Hill et al. 2008).



Figure 13. Cliff aversion test

Şekil 13. Uçurumdan kaçınma testi

C- Rodent Behavior Tests

Behavior can be defined as the whole of the organism's responses to stimuli. In humans, great changes and maturation in synaptic connections and neural networks are observed in parallel with physical development from infancy to adolescence. The 20-day period of rodents provides a rapid brain maturation as well as their physical development. This brain development provides the opportunity to measure and evaluate innate and acquired behaviors. Although the timing of these behavioral and learning-memory assessment tests varies, the approximate assessment time is given starting from the twentieth day after birth (Figure 14). Considering the brain regions affected by hyperoxic brain damage, behavioral, learning and memory tests can be preferred. The age of the animals should also be considered in test preferences.

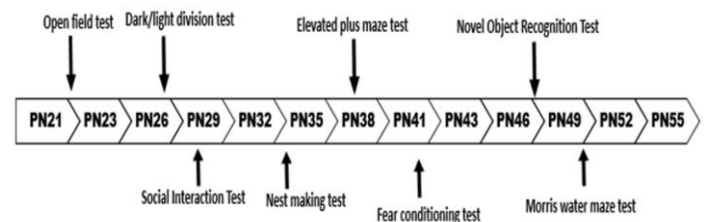


Figure 14. Earliest times to perform learning behavior tests in rodents

Şekil 14. Kemirgenlerde Öğrenme Davranış Testlerin En Erken Yapılma Zamanları

1. Innate Behaviors: Innate behavior tests are a measure the functional integrity of the hippocampus and assess actions such as eating, drinking, and self-care in rodents. The nesting test, instinctively evaluates the nesting behavior of the animal, can be done at PN35-40 days during adolescence. Likewise burrowing which is an innately

important behavior and can be evaluated at PN30-40 days (Eltokhi et al. 2020).

2. Open field test: It is one of the most widely used tests to evaluate behavior. This brief and simple test yields information on the animal's behavior as well as information on its general locomotion and level of depression. (Seibenhener & Wooten, 2015). The foundation of the test is based on the contradiction of exploring the test space and avoiding the open space. Open field testing can be evaluated from the fourth week after birth (Eltokhi et al. 2020).

3. Elevated plus maze test: The elevated plus maze consists of four arms. Two of the arms are open and the other two are closed. Animals are placed on the middle platform of the maze facing the open arm. The total number of entries into the open and closed arms and the total time spent in each arm type are measured. This test can be done at nine weeks after birth (Eltokhi et al. 2020; Hager & Dringenberg, 2010).

4. The forced swim test: This test is one of the most commonly utilized tests to study depression-like behavior in rodents. This test can be done from 6-8 weeks after birth. It is based on the assumption that when animals are placed in a bowl of water, they will first try to escape, but will eventually display inactivity as a measure of behavioral despair (Eltokhi et al. 2020).

5. Evoked Behavior Test: Fear conditioning is tests in which animals learn to associate with stimuli that they do not hear, such as a sound stimulus, electric shock (conditioned stimulus). This test can be done from 7-8 weeks after birth. It has been found that the hippocampus is involved in learning and memory in fear conditioning (Rogan et al. 1997) and the amygdala in sensory fear conditioning is involved in learning (Hager & Dringenberg, 2010; Wiltgen et al. 2006).

6. Passive Avoidance Test: Passive avoidance is a fear-guided test used to evaluate negative reinforcement-based long-term memory in laboratory animals (rat, mice). This test can be done from 7-8 weeks after birth. (Eltokhi et al. 2020).

7. Social Interaction Behavior Test: Social interaction testing can be done at 6-8 weeks after birth. It is done as described by Bandstra et al for social interaction testing. The social interaction test is a learning and memory test that evaluates the social interaction between pairs in

normal room lighting designed in accordance with mouse and rat sizes. Each rat can be randomly assigned to partners with animals from different groups. Each pair stays in the arena for 10 minutes. In a couple's social interaction, sniffing and grooming, crawling under or over the partner, chasing, climbing and crawling are recorded (Bandstra et al. 2010).

8. Cognitive Function and Memory Test: Different tests are performed to measure learning ability and memory function during brain maturation period in rodents. For this purpose, evaluation is made with Morris water maze, T and Y maze, puzzle test and object recognition tests. Since learning and memory tests are related to brain development and maturation, it is more suitable to be done at 6-8 weeks.

9. Morris Water Maze: This test is another common test in small rodents. In this test, water acts as a motivator and stimulant for quick search in animals. A useful aspect of many memory tests is that they can be spread out over days or even weeks. This test facilitates comparison of pre- and post-treatment results (Lueptow, 2017).

10. T-maze and Radial Arm Labyrinths Test: This test is based on encouraging a space to learn and remember its layout with a reward (food pellet). The animal needs to find the handle with the food pellet and remember it in the next attempt. In memory deficiency, it cannot remember and results in the test animal always entering the wrong arm (Lueptow, 2017).

11. Y Maze Innovation Preference test (NPT) : The Y maze can be used to assess short-term memory. It is a behavioral test used to measure rodents' willingness to explore new environments. Many parts of the brain are involved in this task, including the hippocampus, septum, basal forebrain, and prefrontal cortex.

12. Object Recognition Test: It is a test that works on the basis of rodents' curiosity about new objects. The animal will investigate and engage with an object when it sees it for the first time. But if the same thing is shown later, it won't arouse the same attention. The greater the test's success can be interpreted, the more the subjects are drawn to the novel thing and less to the familiar object. The test is simple and can be completed in three days. It can be shortened to study short-term memory or extended to investigate long-term memory (Rogan et al. 1997).

Conclusion

In conclusion, in order to further our understanding of the mechanisms underlying the effects of supplemental oxygen on developing brains, experimental models offer significant information. Translational researchers can benefit from using the best evaluation methods to increase their knowledge of the subject. As the discipline of translational neonatology develops, extensive and standardized tests for the evaluation of newborn experimental motor function in mouse models are needed. These studies can measure the effectiveness of treatments and corroborate experimental patterns of brain disease or injury in rodents. This study seeks to provide light on the behavioral and learning tests that were used by researchers to evaluate the effects of supplementary oxygen on developing brain. When studying neonatal hyperoxic brain injury, it is important to adopt an animal model that is appropriate for the brain's developmental processes and more accurately represents human brain damage. Additionally, it is important to choose the right assesment test and apply it at the appropriate time. The use of motor development, behavior, and memory tests in the functional assesment of the impacted brain regions is crucial. Motor development, behavior, and memory tests should be evaluated in connection to cellular and molecular changes in mouse models of hyperoxic brain injury.

Yazar Katkıları: Fikir- C.Y., O.Y.; Tasarım - C.Y.,D.E., A.K.; Denetleme- O.Y.; Kaynaklar-C.Y.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – C.Y.; Analiz ve/veya Yorum – C.Y, D.E., A.K.; Literatür Taraması – C.Y., O.Y.; Yazıyı Yazan – C.Y., O.Y.; Eleştirel İnceleme – O.Y.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Author Contributions: Concept – C.Y.,O.Y.; Design- C.Y.,D.E., A.K ; Supervision – O.Y.; Resources- C.Y.; Data Collection and/or Processing- C.Y.; Analysis and/or Interpretation- C.Y, D.E., A.K.; Literature Search- C.Y., O.Y. ; Writing Manuscript- C.Y., O.Y. ; Critical Review-O.Y.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

References

- Andresen, J. H., & Saugstad, O. D. (2020). Oxygen metabolism and oxygenation of the newborn. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 25(2), 101078. <https://doi.org/10.1016/j.siny.2020.101078>
- Back, S. A., Luo, N. L., Borenstein, N. S., Levine, J. M., Volpe, J. J., & Kinney, H. C. (2001). Late Oligodendrocyte

- Progenitors Coincide with the Developmental Window of Vulnerability for Human Perinatal White Matter Injury. *The Journal of Neuroscience*, 21(4), 1302–1312. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-04-01302.2001>
- Back, S. A., Riddle, A., & McClure, M. M. (2007). Maturation-dependent vulnerability of perinatal white matter in premature birth. *Stroke*, 38(2 Suppl), 724–730. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000254729.27386.05>
- Balasubramaniam, J., Xue, M., & Del Bigio, M. (2005). Long-term motor deficit following periventricular hemorrhage in neonatal rats: A potential model for human cerebral palsy. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(1_suppl), S242–S242. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9591524.0242>
- Bandstra, E. S., Morrow, C. E., Mansoor, E., & Accornero, V. H. (2010). Prenatal drug exposure: Infant and toddler outcomes. *Journal of Addictive Diseases*, 29(2), 245–258. <https://doi.org/10.1080/10550881003684871>
- Brehmer, F., Bendix, I., Prager, S., van de Looij, Y., Reinboth, B. S., Zimmermanns, J., Schlager, G. W., Brait, D., Sifringer, M., Endesfelder, S., Sizonenko, S., Mallard, C., Bühner, C., Felderhoff-Mueser, U., & Gerstner, B. (2012). Interaction of Inflammation and Hyperoxia in a Rat Model of Neonatal White Matter Damage. *PLoS ONE*, 7(11), e49023. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049023>
- Cameron, N. M., Shahrokh, D., Del Corpo, A., Dhir, S. K., Szyf, M., Champagne, F. A., & Meaney, M. J. (2008). Epigenetic programming of phenotypic variations in reproductive strategies in the rat through maternal care. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(6), 795–801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01725.x>
- Champagne, F. A. (2009). Nurturing nature: Social experiences and the brain. *Journal of Neuroendocrinology*, 21(10), 867–868. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01901.x>
- Chawanpaiboon, S., Vogel, J. P., Moller, A.-B., Lumbiganon, P., Petzold, M., Hogan, D., Landoulsi, S., Jampathong, N., Kongwattanakul, K., Laopaiboon, M., Lewis, C., Rattanakankochai, S., Teng, D. N., Thinkhamrop, J., Watananirun, K., Zhang, J., Zhou, W., & Gülmezoglu, A. M. (2019). Global, regional, and national estimates of levels of preterm birth in 2014: A systematic review and modelling analysis. *The Lancet. Global Health*, 7(1), e37–e46. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(18\)30451-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(18)30451-0)
- Clancy, B., Finlay, B. L., Darlington, R. B., & Anand, K. J. S. (2007). Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology*, 28(5), 931–937. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.014>
- Corti, S., Nizzardo, M., Nardini, M., Donadoni, C., Salani, S., Ronchi, D., Saladino, F., Bordoni, A., Fortunato, F., Del Bo, R., Papadimitriou, D., Locatelli, F., Menozzi, G., Strazzer, *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*

- S., Bresolin, N., & Comi, G. P. (2008). Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 118(10), 3316–3330. <https://doi.org/10.1172/JCI35432>
- Dean, J. M., Moravec, M. D., Grafe, M., Abend, N., Ren, J., Gong, X., Volpe, J. J., Jensen, F. E., Hohimer, A. R., & Back, S. A. (2011). Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Developmental Neuroscience*, 33(3–4), 251–260. <https://doi.org/10.1159/000327242>
- DeSesso, J. M., Scialli, A. R., & Holson, J. F. (1999). Apparent lability of neural tube closure in laboratory animals and humans. *American Journal of Medical Genetics*, 87(2), 143–162. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-8628\(19991119\)87:2<143::aid-ajmg6>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-8628(19991119)87:2<143::aid-ajmg6>3.0.co;2-j)
- Di Florio, D. N., Sin, J., Coronado, M. J., Atwal, P. S., & Fairweather, D. (2020). Sex differences in inflammation, redox biology, mitochondria and autoimmunity. *Redox Biology*, 31, 101482. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101482>
- Dobbing, J., & Sands, J. (1973). Quantitative growth and development of human brain. *Archives of Disease in Childhood*, 48(10), 757–767. <https://doi.org/10.1136/adc.48.10.757>
- Dobbing, J., & Sands, J. (1979). Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Human Development*, 3(1), 79–83. [https://doi.org/10.1016/0378-3782\(79\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0378-3782(79)90022-7)
- El-Khodori, B. F., Edgar, N., Chen, A., Winberg, M. L., Joyce, C., Brunner, D., Suárez-Fariñas, M., & Heyes, M. P. (2008). Identification of a battery of tests for drug candidate evaluation in the SMN Δ 7 neonate model of spinal muscular atrophy. *Experimental Neurology*, 212(1), 29–43. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.02.025>
- Eltokhi, A., Kurpiers, B., & Pitzer, C. (2020). Behavioral tests assessing neuropsychiatric phenotypes in adolescent mice reveal strain- and sex-specific effects. *Scientific Reports*, 10(1), 11263. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67758-0>
- Falsaperla, R., Giacchi, V., Saporito, M. A. N., Pavone, P., Puglisi, F., & Ruggieri, M. (2022). Pulse Oximetry Saturation (SpO₂) Monitoring in the Neonatal Intensive Care Unit (NICU): The Challenge for Providers: A Systematic Review. *Advances in Neonatal Care: Official Journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 22(3), 231–238. <https://doi.org/10.1097/ANC.0000000000000914>
- Farber, J. M., Shapiro, B. K., Palmer, F. B., & Capute, A. J. (1985). The diagnostic value of the neurodevelopmental examination. *Clinical Pediatrics*, 24(7), 367–372. <https://doi.org/10.1177/000992288502400701>
- Farrow, K. N., Lee, K. J., Perez, M., Schriever, J. M., Wedgwood, S., Lakshminrusimha, S., Smith, C. L., Steinhorn, R. H., & Schumacker, P. T. (2012). Brief Hyperoxia Increases Mitochondrial Oxidation and Increases Phosphodiesterase 5 Activity in Fetal Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, 17(3), 460–470. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4184>
- Feather-Schussler, D. N., & Ferguson, T. S. (2016). A Battery of Motor Tests in a Neonatal Mouse Model of Cerebral Palsy. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 117. <https://doi.org/10.3791/53569>
- Felderhoff-Mueser, U., Bittigau, P., Siffringer, M., Jarosz, B., Korobowicz, E., Mahler, L., Piening, T., Moysich, A., Grune, T., Thor, F., Heumann, R., Bühner, C., & Ikonomidou, C. (2004). Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of Disease*, 17(2), 273–282. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.019>
- Fox, W. M. (1965). Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Animal Behaviour*, 13(2), 234–241. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(65\)90041-2](https://doi.org/10.1016/0003-3472(65)90041-2)
- Gerstner, B., DeSilva, T. M., Genz, K., Armstrong, A., Brehmer, F., Neve, R. L., Felderhoff-Mueser, U., Volpe, J. J., & Rosenberg, P. A. (2008). Hyperoxia Causes Maturation-Dependent Cell Death in the Developing White Matter. *The Journal of Neuroscience*, 28(5), 1236–1245. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3213-07.2008>
- Giusto, K., Wanczyk, H., Jensen, T., & Finck, C. (2021). Hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia: Better models for better therapies. *Disease Models & Mechanisms*, 14(2), dmm047753. PubMed. <https://doi.org/10.1242/dmm.047753>
- Grondard, C., Biondi, O., Armand, A.-S., Lécolle, S., Della Gaspera, B., Pariset, C., Li, H., Gallien, C.-L., Vidal, P.-P., Chanoine, C., & Charbonnier, F. (2005). Regular exercise prolongs survival in a type 2 spinal muscular atrophy model mouse. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 25(33), 7615–7622. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1245-05.2005>
- Hager, A. M., & Dringenberg, H. C. (2010). Training-induced plasticity in the visual cortex of adult rats following visual discrimination learning. *Learning & Memory (Cold Spring Harbor, N.Y.)*, 17(8), 394–401. <https://doi.org/10.1101/lm.1787110>
- Heyser, C. J. (2003). Assessment of Developmental Milestones in Rodents. *Current Protocols in Neuroscience*, 25(1), 8.18.1–8.18.15.

- <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0818s25>
- Hill, J. M., Lim, M. A., & Stone, M. M. (2008). Developmental Milestones in the Newborn Mouse. In I. Gozes (Ed.), *Neuropeptide Techniques* (pp. 131–149). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-099-1_10
- Kwak, D. J., Kwak, S. D., & Gauda, E. B. (2006). The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatric Research*, 60(4), 371–376. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000239817.39407.61>
- Lubics, A., Reglodi, D., Tamás, A., Kiss, P., Szalai, M., Szalontay, L., & Lengvári, I. (2005). Neurological reflexes and early motor behavior in rats subjected to neonatal hypoxic-ischemic injury. *Behavioural Brain Research*, 157(1), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.06.019>
- Lueptow, L. M. (2017). Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 126, 55718. <https://doi.org/10.3791/55718>
- Micili, S. C., Engür, D., Genc, S., Ercan, I., Soy, S., Baysal, B., & Kumral, A. (2020). Oxygen exposure in early life activates NLRP3 inflammasome in mouse brain. *Neuroscience Letters*, 738, 135389. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135389>
- Perrone, S., Bracciali, C., Di Virgilio, N., & Buonocore, G. (2017). Oxygen Use in Neonatal Care: A Two-edged Sword. *Frontiers in Pediatrics*, 4, 143. <https://doi.org/10.3389/fped.2016.00143>
- Reich, B., Hoeber, D., Bendix, I., & Felderhoff-Mueser, U. (2016). Hyperoxia and the Immature Brain. *Developmental Neuroscience*, 38(5), 311–330. <https://doi.org/10.1159/000454917>
- Rice, D., & Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives*, 108 Suppl 3, 511–533. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s3511>
- Rogan, M. T., Stäubli, U. V., & LeDoux, J. E. (1997). Fear conditioning induces associative long-term potentiation in the amygdala. *Nature*, 390(6660), 604–607. <https://doi.org/10.1038/37601>
- Saugstad, O. D., Kapadia, V., & Oei, J. L. (2021). Oxygen in the First Minutes of Life in Very Preterm Infants. *Neonatology*, 118(2), 218–224. <https://doi.org/10.1159/000516261>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 96, e52434–e52434. PubMed. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haesslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106–107, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.04.001>
- Serdar, M., Herz, J., Kempe, K., Lumpe, K., Reinboth, B. S., Sizonenko, S. V., Hou, X., Herrmann, R., Hadamitzky, M., Heumann, R., Hansen, W., Siffringer, M., van de Looij, Y., Felderhoff-Müser, U., & Bendix, I. (2016). Fingolimod protects against neonatal white matter damage and long-term cognitive deficits caused by hyperoxia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 52, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.10.004>
- Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology Review*, 20(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>
- Tucker, A. M., Aquilina, K., Chakkarapani, E., Hobbs, C. E., & Thoresen, M. (2009). Development of Amplitude-Integrated Electroencephalography and Interburst Interval in the Rat. *Pediatric Research*, 65(1), 62–66. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e3181891316>
- van Zanten, H. A., Tan, R. N. G. B., Thio, M., de Man-van Ginkel, J. M., van Zwet, E. W., Lopriore, E., & te Pas, A. B. (2014). The risk for hyperoxaemia after apnoea, bradycardia and hypoxaemia in preterm infants. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 99(4), F269–273. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2013-305745>
- Venerosi, A., Ricceri, L., Scattoni, M. L., & Calamandrei, G. (2009). Prenatal chlorpyrifos exposure alters motor behavior and ultrasonic vocalization in CD-1 mouse pups. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 8, 12. <https://doi.org/10.1186/1476-069X-8-12>
- Williams, E., & Scott, J. P. (1954). The development of Social Behavior Patterns in the Mouse, in Relation to Natural Periods 1. <https://doi.org/10.1163/156853954X00031>
- Wiltgen, B. J., Sanders, M. J., Anagnostaras, S. G., Sage, J. R., & Fanselow, M. S. (2006). Context Fear Learning in the Absence of the Hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 26(20), 5484–5491. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2685-05.2006>
- Zafeiriou, D. I. (2004). Primitive reflexes and postural reactions in the neurodevelopmental examination. *Pediatric Neurology*, 31(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2004.01.012>

Ratlarda Yanık Sonrası Seryum Nitrat ve Plateletten Zengin Plazma Tedavilerinin Akciğer Dokusu Üzerine Etkilerinin Histopatolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması

Investigation of the Effects of Cerium Nitrate and Platelet-Rich Plasma Treatments on Lung Tissue Following Burn Injury in Rats Using Histopathological and Immunohistochemical Methods

İsmail BOLAT¹

Esra MANAVOĞLU KIRMAN¹

Kübra Asena TERİM KAPAKİN¹

Fırat ÖZER²



¹Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Erzurum, Turkey

²Gülhane Military Medical Academy, Department of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery, Ankara, Turkey



Öz

Yanık, günümüzde en yaygın görülen fiziksel travmaların başında gelmektedir. Yanık ilk bakışta deride oluşan bir hasar olarak görülse de aslında vücudun genelinden oluşturmuş olduğu sistemik yangısal reaksiyonlar sonucunda birçok doku ve organı etkileyebilmektedir. Bunların başında ise kan dolaşımı yönünden zengin olan akciğer dokusu yer almaktadır. Yanık yarası tedavisinde birçok doğal bileşen çalışmalarda kullanılmıştır. Antiinflamatuar, antioksidan ve antiapoptotik etkinlikleri bilinen Seryum Nitrat (SN) ve Plateletten Zengin Plazma (PZP) bu doğal maddeler arasında yer almaktadır. Bu doğal maddeler her ne kadar yanık tedavisinde kullanılsa da yanık sonrası akciğer dokularında nasıl bir etki ettiği net bir şekilde bilinmemektedir. Bu sebeple, deride oluşturulan termal yanık sonrasında akciğer dokusunda meydana gelen hasara karşı SN ve PZP' nin koruyucu etkinlikleri bu çalışmada araştırıldı. Ratlarda deride çalışmanın ilk gününde termal yanık hasarı oluşturuldu. SN grubunda yanık sonrası 0.04 molar Seryum Nitrat banyo solüsyonunda ratlar 30 dakika boyunca bekletildi. PZP grubunda ise ratların yara bölgelerine 0.1 ml'lik PZP deri altı enjekte edildi. Çalışmanın 21. gününün sonunda ratlar genel anestezi altında sakrifiye edildi ve akciğer dokuları alındı. Akciğer dokularında yanık sonrasında histopatolojik olarak; interalveoler bölgelerde kanama ile mononükleer hücre infiltrasyonları ve buna bağlı olarak kalınlaşma gözlemlendi. Bronşollerin etrafında mononükleer hücre infiltrasyonları görüldü. İmmünohistokimyasal incelemelerde; yanık sonrası akciğer dokularında şiddetli Tnf- α ve 8-OHdG ekspresyonları gözlemlendi. SN ve PZP uygulanan gruplarda ise yanık sonrası oluşan histopatolojik ve immünohistokimyasal bulguların normal değerlere yaklaştığı tespit edildi. Sonuç olarak; yanık sonrası akciğer dokusunda oluşan hasarlara karşı SN ve PZP' nin koruyucu etkinliği olduğu ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, inflamasyon, plateletten zengin plazma, seryum nitrat, yanık.

ABSTRACT

Burn injuries are among the most common physical traumas seen today. Although burns initially appear as damage to the skin, they can actually affect various tissues and organs due to the systemic inflammatory reactions they trigger. One of the primary organs that are rich in blood circulation is the lung tissue. Several natural compounds have been studied for burn wound treatment, among which cerium nitrate (CN) and Platelet-Rich Plasma (PRP) are known for their anti-inflammatory, antioxidant, and antiapoptotic properties. Despite their use in burn treatment, their specific effects on lung tissue following burns remain unclear. Therefore, this study aimed to investigate the protective effects of CN and PRP against damage in lung tissue following thermal burns on the skin. In this study, thermal burn injuries were induced on the skin of rats. In the CN group, rats were exposed to a 0.04 M (molar) cerium nitrate bath solution for 30 minutes after the burn. In the PRP group, 0.1 ml of PRP was subcutaneously injected into the wound areas of the rats. On the 21st day of the study, rats were sacrificed under general anesthesia, and lung tissues were collected. Histopathological analysis of lung tissues after burns revealed bleeding and mononuclear cell infiltrations in the interalveolar regions, leading to thickening. Mononuclear cell infiltrations were also observed around the bronchioles. Immunohistochemical examinations showed severe expressions of Tnf- α and 8-OHdG in lung tissues after burns. However, in the groups treated with CN and PRP, the histopathological and immunohistochemical findings approached normal values after burn injury. In conclusion, CN and PRP demonstrated protective effects against damage in lung tissue following burn injury.

Keywords: Burn, cerium nitrate, inflammation, lung, platelet-rich plasma.

Geliş Tarihi/Received 20.07.2023
Kabul Tarihi/Accepted 26.01.2024
Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding Author:

Kübra Asena TERİM KAPAKİN

E-mail: kubra.terim@atauni.edu.tr

Cite this article: Bolat I., Manavoglu Kirman

E., Terim Kapakin K. A., Ozer F. (2024).

Investigation of the Effects of Cerium

Nitrate and Platelet-Rich Plasma

Treatments on Lung Tissue Following Burn

Injury in Rats Using Histopathological and

Immunohistochemical Methods. *Journal*

of Laboratory Animal Science and

Practices, 4(1), 26-32.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Giriş

Yanık; sıcak veya yakıcı bir madde ile temasa bağlı olarak ortaya çıkan, günümüzde de insanlarda en yaygın görülen travma şeklidir. Isı, radyasyon, kimyasal maddeler ve elektrik gibi bazı maddeler dokunun dayanabileceğinden daha fazla uygulandığında yanıkların oluşmasına neden olurlar. Yanık sonrası dokuda oluşan en önemli komplikasyon ise koagülasyon nekrozlarıdır (Şengezer ve ark. 1995; Jeschke ve ark., 2020; Bazzi ve ark., 2022).

Yanık sonrası oluşan hasarın derecesi yanığa sebep olan maddeye maruz kalma süresi, miktarı, travmanın lokalizasyonu gibi sebeplere bağlıdır. Buna bağlı olarak yanık vücutta lokal bir etki gösterebileceği gibi sistemik reaksiyonlara da sebep olabilmektedir. Bu reaksiyonların en önemlisi de yangısal reaksiyonlardır. Vücutta meydana gelen sistemik yangısal reaksiyonlara (SIRS) bağlı olarak solunum sistemi başta olmak üzere birçok sistem etkilenmektedir. Bu tablonun asıl sebebi ise SIRS ile beraber ortaya çıkan oksidatif strestir. Oksidatif stres, hücrelerde hücre zarı hasarı oluşturmasının yanı sıra hücre DNA' sında da kalıcı hasarlara neden olmaktadır (Şengezer ve ark., 1995; Baskaran ve ark., 2000; Hassan ve ark., 2021).

Akciğer dokusu yaygın dolaşım ağına sahip olduğundan dolayı yanık sonrası en çok etkilenen organların başında gelmektedir. Yanık sonrası akut akciğer hasarı ve devamında da solunum problemlerinin meydana geldiği bilinmektedir. Yine; hipoksemi, pulmoner ödem, solunum yetmezliği gibi klinik tablolarla da karşılaşabilmektedir. Akciğer dokusunda meydana gelen bu durumun sebebinin ise vücutta meydana gelen sistemik yangısal reaksiyonlara bağlı olduğu savunulmaktadır. Ancak bu tablonun patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Son yapılan çalışmalarda ise bu tabloda daha çok yanık sonrası ortaya çıkan tümör nekroz faktörü (TNF)- α , interlökin (IL)-1 β , IL-6, ve IL-8 gibi lokal ve sistemik yangısal mediatörlerin rol oynadığı ortaya konulmuştur (Pruitt ve ark., 1975; Hatherill ve ark., 1986; Oldham ve ark., 1988). Ayrıca vücutta yanık sonrası meydana gelen oksidatif stresin de akciğer dokularında hasarlara neden olduğu bilinmektedir (Cai ve ark., 2022; Şahin ve ark., 2023).

Yanık yaralarının tedavisi eskilerden beri birçok çalışmaya konu olmuştur. Bu tedavilerde kullanılan ilaçların ise antioksidatif, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkinlikleri olmasına dikkat edilmiştir. Son zamanlarda bu ilaçlara ek olarak kök hücre tedavisi de yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Deniz ve ark., 2013; Kayapınar ve ark., 2015; Ozturk ve ark., 2015; Jeschke ve ark., 2019).

Seryum nitrat (SN) ve Plateletten Zengin Plazma (PZP) son yıllarda yanık tedavisinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalarda doğada eser miktarda bulunan SN' nin yanık sonrası vücutta meydana gelen immunsupresif etkiyi ortadan kaldırdığı (Sheidegger ve ark., 1992), ayrıca yanığa bağlı olarak meydana gelen sistemik yangısal reaksiyonu baskılayarak yanığın olumsuz etkisini vücuttan uzaklaştırdığı bildirilmiştir (Deveci ve ark., 2000; Eski ve ark., 2012). Kanın santrifüj edilmesi ile elde edilen platelet ile zenginleştirilen plazma sıvısından oluşturulan PZP'nin (Xie ve ark., 2014), vücutta büyüme hormonları ile antiinflamatuvar sitokinlerin salınmasında rol alarak yara iyileşme sürecini hızlandırdığı ortaya konulmuştur. Ayrıca son yıllarda PZP cerrahi (Xie ve ark., 2014) ve dermatoloji gibi bilimlerde de birçok farklı tedavi yönteminde tedavi amacıyla yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Grambart ve ark., 2015). Son zamanlarda PZP' nin ayrıca yanık sonrası oluşan reaksiyonlara karşı da tedavide ciddi etkisi olduğu bildirilmiştir (Venter ve ark., 2016). Bu çalışma ile SN ile PZP' nin yanık sonrasında vücutta oluşan sistemik yangısal reaksiyonlar ve oksidatif stresin sebep olduğu akciğer hasarına karşı tedavi edici etkisinin farklı metotlar ile araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler

Deney Hayvanları

Çalışmada kullanılacak hayvan materyali, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)'den elde edildi ve çalışmada deneysel süreç ilgili birimde gerçekleştirildi. Çalışmada 250-300 gr ağırlığında, 12 haftalık, 80 adet Sprague Dawley cinsi, erkek rat kullanıldı. Deneysel süreç başlamadan ratlar 7 gün boyunca oda sıcaklığında (25°C), uygun koşullarda, sadece yem ve su verilerek ortama adapte edildi. Deneyde kullanılan 80 adet rattan rastgele 20'şerli 4 grup oluşturuldu. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurul izni (2017/74) alınarak gerçekleştirildi.

Yanık Modelinin Oluşturulması

Çalışmada hayvanlara yanık tarak modeli (Comb Model) uygulanarak deride termal hasar oluşturulmuştur. Bu uygulama 1x2 cm boyutlarında, 4 adet dizi ve 0.5x1 cm' lik boşluklardan oluşacak olan piriçten üretilmiş özel yanık tarağı 100°C kaynayan suda 5 dakika bekletildikten sonra ratların sırt bölgesine 20 saniye süreyle basınç yapmadan simetrik olarak gerçekleştirilmiştir.

PZP' nin Hazırlanması

Yanık oluşturulmayan kontrol grubundan elde edilen 1 ml kan numunesi 0.5 cc sodyum sitrat içeren tüplere alınarak iki aşamalı olarak santrifüj edildi. İlk olarak 1700 devir/dk, 15 dakika olacak şekilde gerçekleştirilen santrifüj işleminde kanın kırmızı küre ve plazma fraksiyonu ayrıldı, daha sonra aynı örnekler 3000 devir/dk, 5 dakika santrifüje edilerek plateletten fakir plazma kısmı ayrıldı ve PZP elde edildi.

Deney Grupları

Kontrol: Ratlar serum fizyolojik ile dolu olan havuzda 30 dakika bekletildi.

Sham Grubu: İlk gün deride dermal hasar oluşturulduktan sonra ratlar %0.9'luk serum fizyolojik solüsyonu içerisinde 30 dakika bekletildi.

Seryum Nitrat (SN) Grubu: Ratlar 0.04 M (molar) Seryum Nitrat banyo solüsyonuna bırakıldı ve 30 dakika boyunca solüsyon içerisinde bekletildi.

Plateletten Zengin Plazma (PZP) Grubu: Termal hasar oluşturulan ratlara hazırlanan 0.1 ml'lik PZP yara bölgesine intradermal olarak enjekte edildi.

Doku Örneklerinin Alınması

Yanık oluşumunda 21 gün sonra her gruptan rastgele seçilen 20 adet rat genel anesteziye (Ksilazin+Ketamin) alınarak sakrifiye edildi. Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için akciğer doku örnekleri alındı.

Histopatolojik İncelemeler

Elde edilen akciğer dokusu örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit ile tespit edildi. Dokular rutin doku takibi prosedürünün ardından bloklandı ve bloklardan 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi (Olympus BX51, JAPONYA). Kesitler histopatolojik bulgularına göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi (Terim Kapakin ve ark., 2013; Iskender ve ark., 2023).

İmmunohistokimyasal İncelemeler

İmmunohistokimyasal boyama prosedüründe primer antikor olarak (TNF-α kat no: sulandırma oranı:1/200 US, 8-OHdG: sc-66036 kat no: sulandırma oranı:1/200 US)

kullanıldı ve antikorlar kullanım prosedürüne uygun olarak inkübe edildi. Kromojen olarak HRP/DAB (3, 3-diaminobenzidine) kromojeni, zemin boyaması için Mayer's hematoksilen solüsyonu kullanıldı. Boyama prosedürünün ardından ışık mikroskobu (Olympus BX51 JAPONYA) ile incelenen kesitler immunpozitifliklerine göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi (Dokumacioğlu ve ark., 2021).

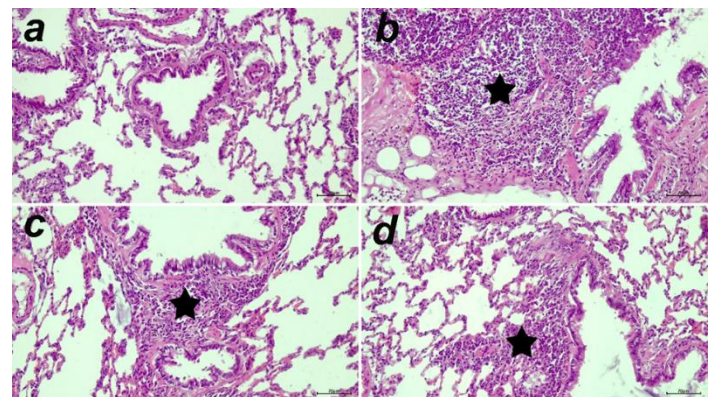
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Graphpad prism programı kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı kabul edilerek veriler değerlendirildi. Gruplar arası karşılaştırımda Duncan testi kullanıldı. Grup etkileşiminin saptanmasında non parametrik Kruskal-Wallis testi, gruplar arasındaki farklılıkları belirlenmesi için Mann Whitney U testi kullanıldı.

Bulgular

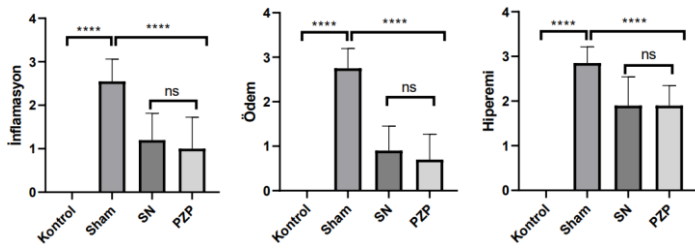
Histopatolojik bulgular

Akciğer doku örnekleri histopatolojik olarak incelendiğinde, kontrol grubunun normal histolojik yapıda olduğu görüldü. Sham grubunda, interalveoler bölgede ve bronşiolerin etrafında şiddetli mononükleer hücre infiltrasyonları tespit edildi. Akciğerlerde alveollerin lümeninde ve interalveoler bölgede şiddetli ödem tablosu saptandı. SN ve PZP gruplarında ise histopatolojik bulguların Sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($p < 0.05$) düzeyde azaldığı saptandı (Şekil 1). Histopatolojik bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 2' de sunuldu.



Şekil 1: Akciğer dokusu; Kontrol (a), Sham (b), SN (c) ve PZP (d). Akciğer dokusunda inflamasyon (yıldız), H&E, Bar: 70µm.

Figure 1: Lung tissue; Control (a), Sham (b), SN (c), and PZP (d). Inflammation in lung tissue (star), H&E, Bar: 70µm.

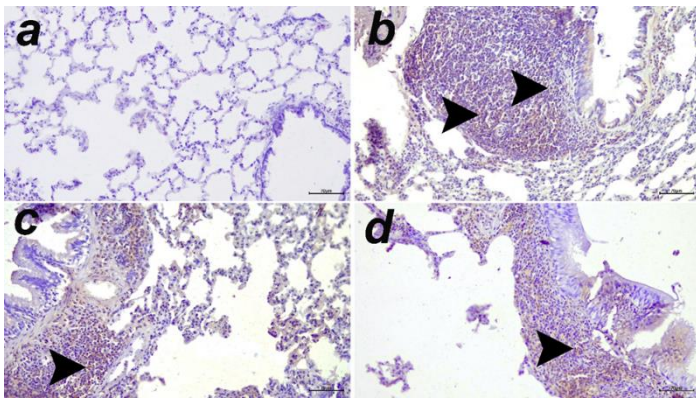


Şekil 2: Akciğer dokusunda histopatolojik bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları (****= $p<0.05$; ns: anlamlı fark yok; $n=20$).

Figure 2: Histopathological findings and statistical analysis results in lung tissue (****= $p<0.05$; ns: no significant difference; $n=20$).

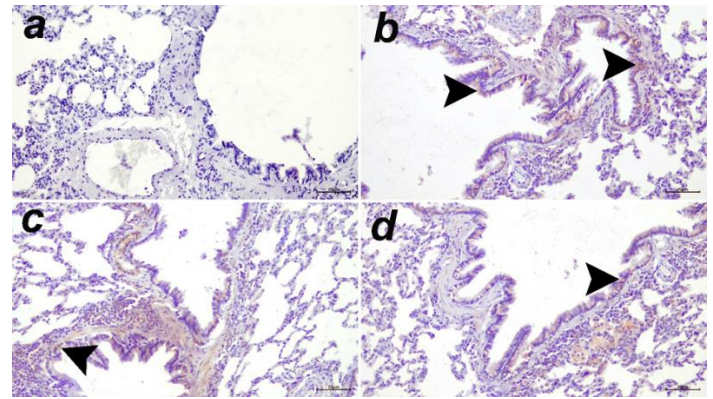
İmmünohistokimyasal bulgular

Akciğer dokularında yapılan immünohistokimyasal analizlerde, kontrol grubunda Tnf- α ve 8-OHdG ekspresyonları negatif olarak değerlendirildi. Sham grubunda yangı hücrelerinde intrasitoplazmik Tnf- α , bronş ve bronşiol epitel hücrelerinde intasitoplazmik 8-OHdG ekspresyonları saptandı. SN ve PZP gruplarında ise hafif düzeyde Tnf- α ve 8-OHdG ekspresyonları gözlemlendi. Sham grubuna kıyasla ekspresyonların istatistiksel olarak anlamlı ($p<0.05$) düzeyde azaldığı saptandı (Şekil 3 ve 4). Histopatolojik bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları Şekil 5' te sunuldu.



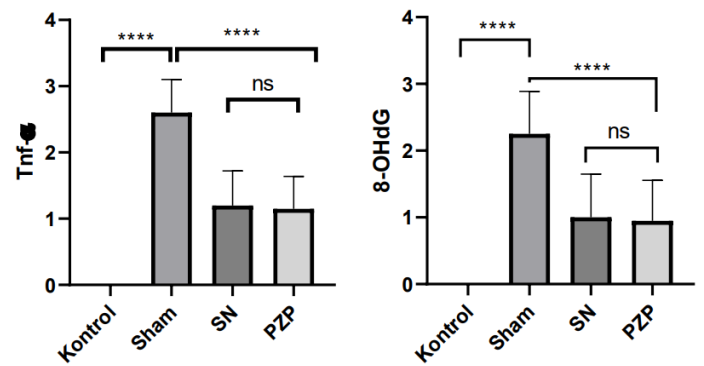
Şekil 3: Akciğer dokusu; Kontrol (a), Sham (b), SN (c) ve PZP (d). Akciğer dokusunda yangı hücrelerinde Tnf- α ekspresyonları (ok başları), IHC-P, Bar: 70 μ m.

Figure 3: Lung tissue; Control (a), Sham (b), SN (c), and PZP (d). Expressions of Tnf- α in inflammatory cells in lung tissue (arrowheads), IHC-P, Bar: 70 μ m.



Şekil 4: Akciğer dokusu; Kontrol (a), Sham (b), SN (c) ve PZP (d). Akciğer dokusunda 8-OHdG ekspresyonları (ok başları), IHC-P, Bar: 70 μ m.

Figure 4: Lung tissue; Control (a), Sham (b), SN (c), and PZP (d). Expressions of 8-OHdG in lung tissue (arrowheads), IHC-P, Bar: 70 μ m.



Şekil 5: Akciğer dokusunda immünohistokimyasal bulgular ve istatistiksel analiz sonuçları (****= $p<0.05$; ns: anlamlı fark yok; $n=20$).

Figure 5: Immunohistochemical findings and statistical analysis results in lung tissue (****= $p<0.05$; ns: no significant difference; $n=20$).

Tartışma

Yanık, aktif yaşamda en sık karşılaşılan travma şekillerinden birisidir. Yanığa ısı, elektrik, kimyasal maddeler gibi birçok değişik faktör sebep olabilmektedir. Yanık genellikle deri dokusunu etkileyen bir travmadır. Ancak vücutta oluşturmuş olduğu sistemik yangısal reaksiyonlara bağlı olarak solunum sistemi başta olmak üzere birçok sistemi olumsuz etkilediği bilinmektedir (Gärtner ve ark., 2001; Church ve ark., 2006; Robertson ve ark., 2006).

Yanık sonrası dolaşım yönünden oldukça zengin bir doku olan akciğer üzerinde yapılan çalışmalarda histopatolojik olarak, intraalveolar ve intersitisyel dokuda meydana gelen konjesyon ve kanamanın yaygın olduğu bildirilmiştir. Akciğerde yanık sonrası görülen en sık bulgu ise ödemdir. Akciğer ödeminin yanık sonrası oluşan protein dengesizliğine bağlı olduğu savunulmuştur (Rathod ve ark., 2014). Yine akciğer dokusunda yanık oluşum sonrasında ortaya çıkan yangısal reaksiyonlara bağlı olarak, interalveolar bölgelerde ve bronşiollerin etrafında yangısal reaksiyonların meydana geldiği bildirilmiştir (AbuBakr ve ark., 2018). Sunulan bu çalışmada da yanık sonrasında akciğer dokularında şiddetli inflamasyon ve kanama ile yaygın ödem tablosu gözlenmiştir. SN (Sheidegger ve ark., 1992; Deveci ve ark., 2000; Eski ve ark., 2012) ve PZP (Xie ve ark., 2014; Grambart ve ark., 2015) birçok yara tedavisinde kullanılmış ve yara iyileşmesinde olumlu sonuçlar alınmış antiinflamatuvar maddelerdir. Bu maddelerin her ne kadar yara iyileşmesine iyi geldiği bilinse de akciğer dokularındaki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada yanık sonrası akciğer dokusunda meydana gelen yangısal reaksiyonları ve ödem oluşumunu SN ve PZP' nin önemli ölçüde azalttığı tespit edilmiştir.

Yanığın hafif olduğu durumlarda yangısal reaksiyonlar genellikle lokal olarak oluşmasına rağmen, şiddetli olgularda bu reaksiyonların vücudun geneline yayıldığı bilinmektedir (Baskaran ve ark., 2000). Bu duruma ise en çok akciğer dokularında rastlanılmaktadır. Akciğer dokuları yaygın damar ağına sahip olduğundan dolayı yanığa bağlı olarak ortaya çıkan yangısal reaksiyonlardan hızlı ve kolay etkilenmektedirler. Yapılan çalışmalarda da yanık sonrası oluşan yangısal reaksiyonlara bağlı olarak akciğer dokularında Tnf- α ekspresyonlarının şiddetli düzeyde arttığı bildirilmiştir (Clancy ve ark., 1997; Clancy ve ark., 2000; Fang ve ark., 2011). Sunulan bu çalışmada da yanık sonrası akciğer dokularında yangı hücrelerinde şiddetli düzeyde Tnf- α ekspresyonlarına rastlanılmıştır. SN (Qian ve ark., 2020; Deldar ve ark., 2021) ve PZP' nin (Ameer ve ark., 2018; Lana ve ark., 2019) antiinflamatuvar etkinlikleri bildirilmesine rağmen, yanık oluşumu sonrasında etkinliklerinin araştırıldığı çalışma mevcut değildir. Yapılan bu çalışmada SN ve PZP' nin yanık sonrası akciğer dokularında Tnf- α salınımını önemli ölçüde azalttığı saptanmıştır.

Deride oluşan yanığa bağlı olarak meydana gelen termal hasar sonucu oluşan serbest radikaller birçok dokuda oksidatif stresi tetikleyerek hücrelerde DNA hasarlarına neden olduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (AbuBakr ve ark., 2018; Khan ve ark., 2020). Yanık sonrası oksidatif

strese bağlı olarak etkilenen organlardan birisi de akciğer dokularıdır. Yapılan bazı çalışmalarda yanık sonrası akciğer dokularında oksidatif strese bağlı olarak 8-OHdG ekspresyon seviyelerinin önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. (Sabehe ve ark., 1995; Csontos ve ark., 2012; Ma ve ark., 2017). Antioksidan etkinliği kanıtlanmış olan SN ve PZP' nin yanık sonrası akciğer dokularındaki antioksidan etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada; yanık sonrası akciğer dokularında oluşan oksidatif DNA hasarına karşı koruyucu etkinliğinin olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç

Sonuç olarak yanık sonrası akciğer dokusunda oluşan inflamasyon ve oksidatif DNA hasarına karşı SN ve PZP' nin antiinflamatuvar ve antioksidan etki göstererek tedavi edici etkisi olduğu ortaya konulmuştur.

Etik Komite Onayı: Etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Sayı: 2017/74) alınmıştır.

Yazar Katkıları: Fikir- İB, KATK; Tasarım- İB, KATK; Denetleme- İB, KATK, FÖ; Kaynaklar- İB, KATK; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi İB, KATK, EMK; Analiz ve/veya Yorum- İB, KATK, FÖ; Literatür Taraması- İB, EMK; Yazıyı Yazan- İB, KATK, EMK, FÖ; Eleştirel İnceleme- KATK, FÖ.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Yazarlar, bu çalışma için finansal destek almadığını beyan etmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was obtained from Atatürk University Animal Experiments Local Ethics Committee (Number: 2017/74)

Author Contributions: Concept- İB, KATK; Design- İB, KATK; Supervision- İB, KATK, FÖ; Resources- İB, KATK; Data Collection and/or Processing- İB, KATK, EMK; Analysis and/or Interpretation- İB, KATK, FÖ; Literature Search- İB, EMK; Writing Manuscript- İB, KATK, EMK; Critical Review- KATK, FÖ.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: The authors declared that this study has received no financial support.

Kaynaklar

- AbuBakr, H. O., Aljuaydi, S. H., Abou-Zeid, S. M., El-Bahrawy, A (2018). Burn-induced multiple organ injury and protective effect of lutein in rats. *Inflammation*, 41, 760-772.
- Ameer, L. A. A., Raheem, Z. J., Abdulrazaq, S. S., Ali, B. G., Nasser, M. M., Khairi, A. W. A. (2018). The anti-inflammatory effect of the platelet-rich plasma in the periodontal pocket. *European Journal of Dentistry*, 12(04), 528-531.
- Baskaran, H., Yarmush, M. L., Berthiaume, F. (2000). Dynamics of tissue neutrophil sequestration after

- cutaneous burns in rats. *Journal of Surgical Research*, 93: 88–96. <https://doi.org/10.1006/jsre.2000.5955>
- Bazzi, A., Ghazanfari, M. J., Norouzi, M., Mobayen, M., Jafaraghaee, F., Zeydi, A. E., Osuji, J., Karkhah, S. (2022). Adherence to referral criteria for burn patients; a systematic review. *Archives of Academic Emergency Medicine*, 10(1). doi: 10.22037/aaem.v10i1.1534
- Cai, W., Shen, K., Ji, P., Jia, Y., Han, S., Zhang, W., Hu, X., Yang, X., Han, J., Hu, D. (2022). The Notch pathway attenuates burn-induced acute lung injury in rats by repressing reactive oxygen species. *Burns Trauma*, 10, tkac008. <https://doi.org/10.1093/burnst/tkac008>
- Church, D., Elsayed, S., Reid, O., Winston, B., Lindsay, R. (2006). Burn wound infections. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 403-434. Doi:<https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.403-434.2006>
- Clancy, K. D., Lorenz, K., Dries, D., Gamelli, R. L., Hahn, E. L. (2000). Chlorpromazine modulates cytokine expression in the liver and lung after burn injury and endotoxemia. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 48(2), 215-223.
- Clancy, K. D., Lorenz, K., Hahn, E., Christiansen, B., Hofmann, C., Gamelli, R. L. (1997). Down-regulation of tissue specific tumor necrosis factor-alpha in the liver and lung after burn injury and endotoxemia. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 42(2), 169-176.
- Csontos, C., Rezman, B., Foldi, V., Bogar, L., Drenkovics, L., Röth, E., Lantos, J. (2012). Effect of N-acetylcysteine treatment on oxidative stress and inflammation after severe burn. *Burns*, 38(3), 428-437.
- Deldar, R., D'Arpa, P., Moffatt, L., Leung, K., Shupp, J. (2022). Cerium nitrate treatment in the management of burns. *Advances in Wound Care*, 11(8), 443-454.
- Deniz, M., Borman, H., Seyhan, T., Haberal, M. (2013). An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-acetylcysteine. *Burns*, 39, 320–5. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2012.06.015>
- Deveci, M., Eski, M., Sengezer, M., Kisa, U. (2000). The effect of cerium nitrate bathing and prompt burn wound excision on IL-6 and TNF-a levels in burned rat. *Burns*, 26, 41–5. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(99\)00107-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(99)00107-2)
- Dokumacıoğlu, E., Iskender, H., Terim Kapakin, K. A., Yenice, G., Mokhtare, B., Bolat, İ., Hayirli, A. (2021). Effect of betulinic acid administration on TLR-9/NF-KB/IL-18 levels in experimental liver injury. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 51(3), 1544-1553. Doi: 10.3906/sag-2004-184.
- Eski, M., Ozer, F., Firat, C., Alhan, D., Arslan, N., Senturk, T., Isik, S. (2012). Cerium nitrate treatments prevent progressive tissue necrosis in the zone of stasis following burn. *Burns*, 38, 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2011.08.008>
- Fang, Y., Xu, P., Gu, C., Wang, Y., Fu, X. J., Yu, W. R., Yao, M. (2011). Ulinastatin improves pulmonary function in severe burn-induced acute lung injury by attenuating inflammatory response. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 71(5), 1297-1304. [10.1097/TA.0b013e3182127d48](https://doi.org/10.1097/TA.0b013e3182127d48).
- Gärtner, R., Albrich, W., Angstwurm, M. W. (2001). The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. *Biofactors*, 14(1-4), 199-204.
- Grambart, S. T. (2015). Sports medicine and platelet-rich plasma: nonsurgical therapy. *Clinics in podiatric medicine and surgery*, 32, 99-107. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.cpm.2014.09.006>
- Hassan, M. A., El Bohy, K. M., El Sharkawy, N. I., Imam, T. S., El-Metwally, A. E., Hamed Arisha, A., Abd-Elhakim, Y. M. (2021). Iprodione and chlorpyrifos induce testicular damage, oxidative stress, apoptosis and suppression of steroidogenic-and spermatogenic-related genes in immature male albino rats. *Andrologia*, 53(4), e13978. <https://doi.org/10.1111/and.13978>
- Hatherill, J. R., Till, G. O., Bruner, L. H., Ward, P. A. (1986). Thermal injury, intravascular hemolysis, and toxic oxygen products. *The Journal of Clinical Investigation*, 78(3), 629-636.
- Iskender, H., Dokumacıoğlu, E., Terim Kapakin, K. A., Bolat, I., Mokhtare, B., Hayirli, A., Yenice, G. (2023). Effect of Oleanolic acid administration on hepatic AMPK, SIRT-1, IL-6 and NF-κB levels in experimental diabetes. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders*, 1-10.
- Jeschke, M. G., Rehou, S., McCann, M. R., Shahrokhi, S. (2019). Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of severe burn injury. *Stem cell research and therapy*, 10(1), 1-6.
- Jeschke, M.G., Van Baar, M.E., Choudhry, M.A., Chung, K.K., Gibran, N.S., Logsetty, S. (2020). Burn injury. *Nature Reviews Disease Primers*, 6(1), 11.
- Kayapınar, M., Seyhan, N., Avunduk, M. C., Savacı, N. (2015). Saving the zone of stasis in burns with melatonin: an experimental study in rats. *Ulusal Travma Acil Cerrahi Dergisi*, 21, 419-424. DOI: 10.5505/tjtes.2015.53059
- Khan, A., Shal, B., Naveed, M., Nasir, B., Irshad, N., Ali, H., Khan, S. (2020). Matrine alleviates neurobehavioral alterations via modulation of JNK-mediated caspase-3 and BDNF/VEGF signaling in a mouse model of burn injury. *Psychopharmacology*, 237(8), 2327-2343.
- Lana, J. F., Huber, S. C., Purita, J., Tambeli, C. H., Santos, G. S., Paulus, C., Annichino-Bizzacchi, J. M. (2019). Leukocyte-rich PRP versus leukocyte-poor PRP-The role of monocyte/macrophage function in the healing cascade. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*, 10, S7-S12.
- Ma, J., Wang, Y., Wu, Q., Chen, X., Wang, J., Yang, L. (2017).

- Seawater immersion aggravates burn-associated lung injury and inflammatory and oxidative-stress responses. *Burns*, 43(5), 1011-1020.
- Oldham, K. T., Guice, K. S., Till, G. O., Ward, P. A. (1988). Activation of complement by hydroxyl radical in thermal injury. *Surgery*, 104(2), 272-279.
- Ozturk, S., Karagoz, H. (2015). Experimental stem cell therapies on burn wound: Do source, dose, timing and method matter?. *Burns*, 41, 1133-1139. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2015.01.005>
- Pruitt, J. R., Basil, A., Daryl, R., Erickson, A., Alan, M. (1975). Progressive pulmonary insufficiency and other pulmonary complications of thermal injury. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 15(5), 269-379.
- Qian, L. W., Fourcaudot, A. B., Chen, P., Brandenburg, K. S., Weaver Jr, A. J., Leung, K. P. (2020). Cerium nitrate enhances anti-bacterial effects and imparts anti-inflammatory properties to silver dressings in a rat scald burn model. *International Journal of Burns and Trauma*, 10(4), 91.
- Rathod, M. R., Goswami, H., Jankar, D. (2014). A study of histopathological changes in burn deaths at civil hospital Ahmedabad-Gujarat. *Int J Res Med*, 3(1), 42-45.
- Robertson, C. M., Coopersmith, C. M. (2006). The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes and Infection*, 8(5), 1382-1389. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.12.016>
- injury and oxidative stress in liver and lung tissues of rabbit models. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33:323-328.
- Sheidegger, D., Sparkes, B. G., Luscher, N., Schonenberger, G. A., Allgower, M. (1992). Survival in major burns treated by one bathing in cerium nitrate. *Burns*, 18, 296-300.
- Şahin, Y., Gün Gök, Z., Alçıgır, M. E., Çınar, M. (2023). Effects Of Functional Poly (Ethylene Terephthalate) Nanofibers Modified With Sericin-Capped Silver Nanoparticles On Histopathological Changes In Parenchymal Organs And Oxidative Stress In A Rat Burn Wound Model. *Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 70(2), 131-140. DOI: 10.33988/auvfd.990270
- Şengezer, M., Selmanpakoğlu, N., Duman, H., Çetin, C. (1995). Epidemiological analysis of burn injuries in Gülhane Military Medical Academy Burn Center. *Türk Plast Cer Derg*, 3(1), 74-7.
- Terim Kapakin, K. A., Imik, H., Gumus, R., Kapakin, S., Sağlam, Y. S. (2013). Effect of Vit E on secretion of HSP-70 in testes of broilers exposed to heat stress. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 19(2). DOI: 10.9775/kvfd.2012.7771
- Venter, N. G., Marques, R. G., Dos Santos, J. S., Monte-Alto-Costa, A. (2016). Use of platelet-rich plasma in deep second-and third-degree burns. *Burns*, 42(4), 807-814. doi: 10.1016/j.burns. 2016.01.002.
- Xie, X., Zhang, C., Tuan, R. S. (2014). Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis research and therapy*, 16, 1-15.

The Prevalence of *Helicobacter* spp. in Licensed Experimental Animal Facilities in Aegean Region, Turkey*

Ege Bölgesindeki Ruhsatlı Deney Hayvanı Tesislerinde *Helicobacter* spp. Prevalansı*

Necdet İlker İÇİL¹

Göksel ERBAŞ²



¹Izmir/Bornova Veterinary Control Institute, Izmir, Türkiye

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



Statement (* This research was summarized from Necdet İlker İÇİL's PhD thesis and was supported by Aydın Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit (Project No: VTF21029).

Geliş Tarihi/Received 13.01.2024
Kabul Tarihi/Accepted 11.03.2024
Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author:

Necdet İlker İÇİL

E-mail: necdetilkericil@gmail.com

Cite this article: İÇİL, N. İ., Erbaş G. (2024).

The Prevalence of *Helicobacter* spp. in Licensed Experimental Animal Facilities in Aegean Region, Turkey. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(1), 33-43.

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the presence of *Helicobacter* spp. and *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* and *H. typhlonius* species in mice, rats and gerbils in the Aegean Region. Colon and stool samples were collected from a total of 200 animals, 10 mice, 10 rats and 10 gerbils, from separate cages randomly selected between the ages of 15- 22 weeks from each of the 11 licensed experimental animal facilities. From the DNA obtained, *Helicobacter* spp. 16S ribosomal RNA gene was determined by PCR method, and positive samples were determined by multiplex PCR. The prevalence of *Helicobacter* spp. in mice was 90.91 %. According to the species-based PCR results of the positive samples, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 90.91 %. In the study in which *H. bilis* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, it was determined that *H. typhlonius* was the second most common species with a prevalence rate of 72.73 %, followed by *H. hepaticus* with a prevalence of 27.27 %. The prevalence of *Helicobacter* spp. in rats was 87.5 %. According to the PCR results of the positive samples, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 87.5 %. In the study where *H. bilis*, *H. hepaticus* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, *H. typhlonius* was the second common species with a prevalence of 12.5 % in rats. On the other hand, only *H. rodentium* and *H. typhlonius* were detected in the colon samples taken from a single facility containing gerbils. It was determined that *Helicobacter* spp., which causes infections in experimental animals, especially subclinical, is quite common in the study area. It is recommended that the Experimental Animal facilities monitorize for this agent.

Keywords: Gerbil, *Helicobacter* spp., mice, rat.

Öz

Bu çalışmayla Ege Bölgesindeki fare, rat ve gerbillerde *Helicobacter* spp. ve *H. hepaticus*, *H. bilis*, *H. muridarum*, *H. rodentium* ve *H. typhlonius* türlerinin varlığının araştırılması amaçlanmıştır. Ruhsatlı 11 adet deney hayvanı tesisinin her birinden 15-22 haftalık yaşlar arasından rastgele seçilen ayrı kafeslerden 10 adet fare, 10 adet rat ve 10 adet de gerbil olmak üzere toplam 200 hayvandan kolon ve dışkı örnekleri toplanmıştır. Elde edilen DNA'lardan *Helicobacter* spp., 16S ribozomal RNA geni kullanılarak PCR yöntemi ile pozitif örneklerin tür tayini ise multiplex PCR ile belirlenmiştir. Farelerde *Helicobacter* spp. prevalansı % 90.91 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin tür bazındaki PCR sonuçlarına göre en yaygın tür % 90.91 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* % 72.73 prevalans oranıyla ikinci yaygın tür olurken onu % 27.27'lik prevalansla *H. hepaticus*'un takip ettiği tespit edilmiştir. Ratlarda *Helicobacter* spp. prevalansı % 87.5 olarak gerçekleşmiştir. Pozitif örneklerin PCR sonuçlarına göre en yaygın tür % 87.5 prevalansla *H. rodentium* olmuştur. *H. bilis*, *H. hepaticus* ve *H. muridarum* türlerinin hiçbir tesiste tespit edilmediği çalışmada *H. typhlonius* % 12.5 prevalans oranıyla ikinci yaygın türdür. Gerbil bulunduran tek tesisten alınan kolon örneklerinde ise sadece *H. rodentium* ve *H. typhlonius* tespit edilmiştir. Çalışmaya konu olan bölgede, özellikle subklinik olmak üzere deney hayvanlarındaki enfeksiyonlara neden olan *Helicobacter* spp.'nin oldukça yaygın olduğu belirlenmiştir. Deney Hayvanı tesislerinin bu ajan yönünden takibinin yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Fare, Gerbil, *Helicobacter* spp., sıçan.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Introduction

Environmental and genetic factors and their interactions with each other may affect the suitability of animals to be used for experimental purposes in research. Since the emergence of infectious agents in facilities that produce or use laboratory animals not only directly affects scientific research projects due to experimental variability, but also affects animal welfare, the need to take into account the microbiological quality of these facilities has arisen (Mähler et al., 2014). Ensuring the reproducibility of research, which is one of the scientific requirements, is a widely accepted approach that requires laboratory animals that are free from diseases and other conditions that could affect experimental results (Matos-Rodrigues et al., 2020). In this context, it is recommended that every institution establishes a laboratory animal 'Health Monitoring' program integrated into any quality assurance system (Mähler et al., 2014; Bracken et al., 2017). In routine screenings of the 'Health Monitoring' program recommended by the European Federation of Laboratory Animal Science Societies (FELASA); *Helicobacter* spp. is among the infectious agents recommended to be monitored every 3 months for laboratory animals (Mähler et al., 2014).

Helicobacter-associated disease is not clinically observable in most immunocompetent rodents. However, when immunodeficient or transgenic mice with immune system abnormalities are infected experimentally or naturally, subclinical inflammation develops up to the morbidity stage (Whary and Fox, 2006). Although uncertainty in clinical presentation is limited to mono-infected animals, infections with more than one species can produce pathological lesions. For example, it is emphasized that mixed infection with *H. rodentium* may potentiate disease caused by more pathogenic species such as *H. hepaticus* or *H. bilis*, with the assumption that *H. rodentium* may be an acceptable contaminant in most conventional mouse colonies (Myles et al., 2003).

It is known that some enterohepatic strains of *Helicobacter* spp., which can cause clinical symptoms as well as a subclinical course in laboratory rodents, are associated with reduced reproductive performance, rectal prolapse, inflammatory bowel disease and typhlocolitis. *H. hepaticus* and *H. bilis* can also cause hepatitis and hepatocarcinoma in mice. These factors cause microbiological quality to negatively affect not only experimental quality but also production and breeding

dynamics (Whary and Fox, 2006).

The first study on the prevalence of the microorganism in question was conducted by Shames et al. (1995) in 1995, solely for the screening of *H. hepaticus*. In this study, twenty-eight different strains or stocks, a total of 160 mice from 4 facilities, were used and it was reported that *H. hepaticus* was detected in two of the four facilities, therefore the prevalence is 50% realized. The incidence was determined as 100% in one of the positive facilities and 52% in the other. In a facility that tested negative for *H. hepaticus*, *H. bilis* was detected with an incidence of 55% (Shames et al., 1995). Another data showing the presence of naturally acquired *Helicobacter* infections in all commonly used laboratory rodent species and the majority of the frequently isolated species from samples taken from infected mice were reported by Taylor et al. (2007).

Another study revealing the prevalence of *Helicobacter* spp. compared to other bacterial agents screened was Pritchett-Corning et al. (2009) was conducted in a wide geography using a very high number of animals. According to the results of the study on the European and North American prevalence of infectious agents seen in laboratory mice and rats, the most common bacterial agent in mice was *Helicobacter* spp. with an average rate of 16.08%, and the most common species in this genus was *H. hepaticus* with 12.37%. Although the rat results of the same study differed proportionally from the mouse results, they did not change in terms of the most common bacterial agent (Pritchett-Corning et al., 2009). In a study conducted by Goto et al. (2000), the prevalence of *H. hepaticus* was 25.5%, the prevalence of *H. bilis* was 2.1%, and the prevalence of *H. rodentium* was 23.4%. It was found together with *H. hepaticus* and *H. rodentium* in 47 mice (5.7%) from six colonies.

Since it avoids euthanasia using feces for sampling, it will provide a reliable and easy method to achieve the 3Rs (refinement, reduction, replacement) in screening tests and clinical research (Neubert et al., 2022). Various studies have been conducted regarding the differences between sampling sites in terms of bacterial detection. In a study by Nilsson et al. (2004) in a study; *Helicobacter* DNA was detected at a rate of 85.7% in the fecal samples of 9 mouse strains housed in 4 different facilities, and this rate was the highest rate compared to other tissues and samples. In the first study on this subject conducted by Shames et al. (1995), it was reported that colon culture results had a 100% compatibility with cultivating fecal filtrate. Another

study in which the effect of colon and stool samples on the results was found to be insignificant was Beckwith et al. (1997). In one of the recent study that included a comparison of sampling, it was reported that fecal samples may be negative for *Helicobacter* in some cases where the intestines are positive (Cao et al., 2020). Another study reporting results in favor of the colon between two sampling sites was Matos-Rodrigues et al. (2020). In this study, in terms of *Helicobacter* spp., which was 59.6% in fecal samples, was reported as 70.1% in colon samples.

It is stated that the PCR method is the most sensitive and reliable tool to detect *Helicobacter* spp. infection due to the difficulty of culturing *Helicobacter* spp., histopathological diagnosis not being sensitive or specific, and serological methods lacking specificity in mixed infections. (Whary and Fox, 2006). In this study, *Helicobacter* spp. was detected locally in mice, rats and gerbils. In addition to determining its presence, it is planned to identify and verify a sampling method suitable for routine screening. PCR was used as the detection method in the study.

Materials and Methods

Colon and stool samples were collected from a total of 200 animals, 10 mice, 10 rats and 10 gerbils, from separate cages randomly selected between the ages of 15-22 weeks from each of the 11 licensed experimental animal facilities (110 mice, 80 rats and 10 gerbils are kept in only one facility). Since only 8 of the eleven facilities kept and used rats, the number of samples representing rats was limited to 80. These animals were placed in individual cages by prior consultation with the facility manager, thus ensuring that the fecal samples belonged to these animals. Samples taken from these animals formed the sample pool. By combining the colon and fecal samples of the animals taken from the facilities, 1 rat colon and fecal sample, 1 mouse colon and fecal sample, and a gerbil colon and fecal sample set representing each facility were created (Table 1). Mice, rats and gerbils were euthanized with CO₂ before taking the colon sample, and a colon sample of approximately 1 cm in length was taken from each animal under aseptic conditions in the Bacteriology Department of Bornova Veterinary Control Institute. Thus, the study was conducted with a total of 40 samples, including 20 colon samples and 20 stool samples related to these samples. Stool and intestinal sections were kept at -20°C until analysis.

Table 1. Sampling chart

Tablo 1. Örnekleme tablosu

Sampling facility	Animal species and numbers sampled					
	Mice		Rat		Gerbil	
	Feces	Colon	Feces	Colon	Feces	Colon
1st	10	10	-	-	-	-
2nd	10	10	10	10	-	-
3th	10	10	10	10	-	-
4th	10	10	10	10	-	-
5th	10	10	-	-	-	-
6th	10	10	10	10	-	-
7th	10	10	10	10	-	-
8th	10	10	10	10	-	-
9th	10	10	10	10	10	10
10th	10	10	-	-	-	-
11th	10	10	10	10	-	-
Total number of animals	110	110	80	80	10	10
Number of samples obtained	11	11	8	8	1	1
Total number of samples	40					

In the study conducted with the approval of Bornova Veterinary Control Institute Local Ethics Committee 2021/453425.

DNA isolation: DNA isolation was performed according to the method of Shames et al. (1995). Briefly, each sample set was suspended in 10 ml of PBS and vortexed. The mixture was centrifuged for 10" at 6000 rpm and the supernatant was filtered through a 0.8 µm filter. The resulting filtrate was centrifuged at 13,500 rpm 5' and DNA extraction from the pellet was purified using the "QiagenStool Mini Kit" (QIAGEN Inc., Valencia, CA) according to the protocol.

PCR: It was performed as a genus-specific and species-specific multiplex. *H. pylori* ATCC 43504 strain obtained from Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Clinical Microbiology was used for the genus-specific 16S ribosomal RNA gene positive control.

For *Helicobacter* spp., the sequences H276f: 5'-TATGACGGGTATCCGGC-3' and H676r: 5'-ATCCACCTACCTCTCCA-3', generated from the 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA), were used (Riley et al., 1996; Beckwith et al., 1997). In multiplex PCR studies, species-specific 16S rRNA primer sequences listed in Table 2 were used for each *Helicobacter* species (Feng et al., 2005).

The PCR process was carried out in a total volume of 50 μ l by mixing 25 μ l of HotStarTaq Master mix (QIAGEN Inc., USA), 1 μ l of template DNA, 1 μ l of each primer sequence of 100 μ M (200 μ M for multiplex) and 22 μ l of distilled water. Colon DNA concentration was used as (single 1.25 μ g / ml, multiplex 5 μ g / ml), and fecal DNA concentration was used as (single 5 μ g / ml, multiplex 14 μ g / ml) (Feng et al., 2005). Conditioning (45 cycles): heating at 94°C for 30", denaturation at 94°C for 2", annealing at 53°C for 2" and extension at 72°C for 30" was applied.

10 μ l of 50 μ l PCR products created in 0.2 mL tubes were taken with the help of a pipette and mixed with 3 μ l of 6x loading dye solution. The entire mixture was taken and loaded into the well in the appropriate position in the 1% agarose gel, and it was run for 40 minutes for *Helicobacter* spp. and 60 minutes for multiplex PCR at 80V 500A. The gel was placed in the chamber of the transilluminator device connected to the computer. After photographing under UV light, band lengths were evaluated separately for each PCR.

Statistical analysis for sampling comparisons; Frequency analyzes and Chi-square test were applied to test significance between groups. Minitab 19 statistics program was used for this process. (Minitab, LLC. 2021)

The study was conducted in Bornova Veterinary Control Institute and Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine Microbiology Laboratories.

Table 2. Primer sequences of species (Feng et al., 2004)**Tablo 2.** Türlerin primer dizileri (Feng et al., 2004)

Species	Primer sequences	Lenght (bp)
<i>H. rodentium</i>	1201f TGTGAAATGGAGCAAATCTTAAAAACT	191
	1375r TAGCCAGTTTGGCATTCC	
<i>H. typhlonius</i>	163f. AGGGACTCTTAAATATGCTCCTAGAGT	122
	262r ATTCATCGTGTTGAATGCGTCAA	
<i>H. bilis</i>	p17f ATGGAACAGATAAAGATTTTAAAGCAACTTCAG	435
	p17r CTATGCAAGTTGTGCGTTAAGCAT	
<i>H. hepaticus</i>	p25f ATGGGTAAGAAAATAGCAAAAAGATTGCAA	705
	p25 r CTATTTTCATATCCATAAGCTCTTGAGAATC	
<i>H. muridarum</i>	p30f ATGACAAAAAATATTCTTTCACAAAACACTATTATTGGT	807
	p30r TTTATTTTAGATTCCATTAACTGCTAAATCATCAATAGT	

f:forward; r:reverse.

Results

Mice Results

In the study conducted on the samples obtained; *Helicobacter* spp. was detected in mice in all except one facility. According to this result, the prevalence was determined as 90.91%. According to multiplex PCR results, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 90.91%. In the study, in which *H. bilis* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, it was determined that *H. typhlonius* was the second most common species with a prevalence rate of 72.73%, followed by *H. hepaticus* with a prevalence of 27.27% (Table 3).

According to the multiplex PCR results (Figure 1), it was determined that *H. rodentium* was present in all facilities where *Helicobacter* spp. was detected. It was determined that 2 of the facilities were infected with *H. hepaticus* in addition to *H. rodentium*, and 7 of them were mixed with *H. typhlonius* in addition to *H. rodentium*. It was determined that one facility was infected with more than two species. Considering these findings, the resulting rates are as seen in table 3. Accordingly, the rate of facilities with

mixed infections with two species was determined as 90%, and the rate of facilities with mixed infections with more than two species was determined as 10% (Table 4).

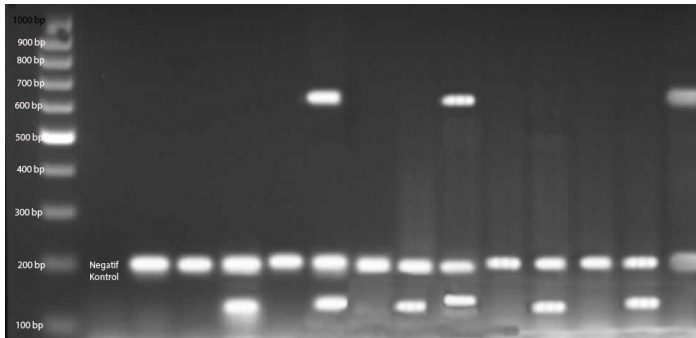


Figure 1. Multiplex PCR performed with bacterial DNA of three *Helicobacter* strains

Şekil 1. Üç *Helicobacter* suşunun bakteriyel DNA'sı ile gerçekleştirilen multipleks PCR

Rats Results

Helicobacter spp. was not detected in 1 of the 8 facilities where the study was conducted, and *H. rodentium* was found in all of the facilities where *Helicobacter* spp. was detected. According to this result, the prevalence was 87.5%. According to the results of Multiplex PCR (Figure 1) using the DNA of *Helicobacter* spp. positive samples, the most common species was *H. rodentium* with a prevalence of 87.5%. In the study, where *H. bilis*, *H. hepaticus* and *H. muridarum* species were not detected in any facility, *H. typhlonius* was the second common species with a prevalence rate of 12.5% (Table 3).

The number of facilities monoinfected with *H. rodentium* alone was determined as six. It was determined that one facility was mixed infected with *H. typhlonius* in addition to *H. rodentium*. There are no breeding facilities infected with more than two species in rat colonies (Table 4).

Gerbils Results

Helicobacter spp. was detected in the sample taken from the facility that kept gerbils. As a result of multiplex PCR for species-based discrimination using the DNA of the *Helicobacter* spp. positive sample obtained, only *H. rodentium* and *H. typhlonius* were detected in the colon samples.

Sampling Site Comparisons

When the results obtained from all animal species subject to the study are compared on the basis of sampling location (Feces - Colon); While it was observed that *H. hepaticus* was found at a higher rate in the colon samples with 11.11% versus 5.56%, the proportion of *H. typhlonius* was higher in the stool sample with 50 % versus 44.44 %. However, when these results were compared, it was determined that the difference between the two sample results was statistically insignificant ($p>0,05$), (Table 5).

Table 3. *Helicobacter* spp. in facilities and distribution rates by species**Tablo 3.** Tesislerdeki *Helicobacter* spp. ve türlere göre dağılım oranları

Number of Facilities	Positive %					
	Mice (n=110)		Rats (n=80)		Gerbils (n=10)	
	11		8		1	
	Feces	Colon	Feces	Colon	Feces	Colon
<i>Helicobacter</i> spp.	90.91	90.91	87.50	87.50	0.00	100.00
<i>H. rodentium</i>	90.91	81.82	87.50	87.50	0.00	100.00
<i>H. typhlonius</i>	72.73	63.64	12.50	12.50	0.00	100.00
<i>H. bilis</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>H. hepaticus</i>	9.09	18.18	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>H. muridarum</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 4. Mixed infection rates in facilities**Tablo 4.** Tesislerdeki karışık enfeksiyon oranları

		Mice		Rats	
		Number of Facilities	Ratio%	Number of Facilities	Ratio%
Monoinfected		-	-	6	85.7
	Two species	9	90	1	14.3
Polyinfected	More than two species	1	10	-	-
Total		10	100	7	100

Table 5. Sampling site comparisons.**Tablo 5.** Örnekleme alanı karşılaştırmaları.

		<i>Helicobacter</i> spp.	<i>H. rodentium</i>	<i>H. typhlonius</i>	<i>H. bilis</i>	<i>H. hepaticus</i>	<i>H. muridarum</i>
Fecal sample	Pozitive	18	17	9	0	1	0
	Negative	1	1	9	0	17	0
	Total	19	18	18	0	18	0
	Proportion %	94,70	94,44	50,00	0,00	5,56	0,00
Colon sample	Pozitive	18	17	8	0	2	0
	Negative	1	1	10	0	16	0
	Total	19	18	18	0	18	0
	Proportion %	94,70	94,44	44,44	0,00	11,11	0,00
	P value	-	-	0,49	-	0,54	-

Discussion

In clinical signs; The data we obtained regarding the clinical signs supports the data regarding the clinical disease reported by Solnick and Schauer (2001). Because these researchers emphasize that there are very few examples of *Helicobacter* species infection of an immunocompetent, natural host causing clinical disease. However, there are also study results in the literature showing that *H. typhlonius* and *H. hepaticus*, especially mixed infections, can cause clinical symptoms. These mentioned species and their mixed infection rates and findings are discussed below.

In the study conducted by Bohr et al. (2006), it was stated that 27 of a total of 40 mice strains, 37 inbred and 3 outbred, housed in an SPF facility, carried a single *Helicobacter* species, while 8 mice strains were infected by at least two different *Helicobacter* species. In the presented study, more than one species was detected in all samples taken from ten facilities. This data shows a proportionally higher rate than the results of the study conducted by Bohr et al. (2006). It is thought that the difference between the obtained rates may be due to the fact that the compared study is SPF. Another study on mixed infections was conducted by Taylor et al. (2007). The study, whose material consisted of samples taken from research institutes in the United States, Canada, Europe, Australia and Asia, showed that 6% of the institutes had at least three *Helicobacter* spp. showed that 29% were colonized with two *Helicobacter* species and 47% were colonized with a single *Helicobacter* species. In the presented study, the infection rate with more than two species, 10%, was similar to the value found in this study, but the infection rate with two species (90%) was higher to that of Taylor et al. (2007) reported.

It was determined that 8 of the 11 mice colonies and one of the 8 rat colonies where the study was conducted were mixed infected with *H. typhlonius*, which is stated to cause mucosal hyperplasia and related inflammation in the cecum and colon in immunodeficient mice, in addition to *H. rodentium*. It was observed that *H. typhlonius*, which recommended further research on naturally occurring gastrointestinal lesions in immunocompetent mice by Franklin et al. (2001), did not cause a clinical signs even in mixed infections.

It is stated that *H. rodentium* is not pathogenic in adult wild-type mice, but it increases IL-10 production in the cecum of *H. hepaticus*-infected mice (Franklin et al., 2001) and infections with more than one species can cause pathological lesions (Myles et al., 2004). While it is hypothesized that *H. rodentium* may be an acceptable contaminant in most conventional mouse colonies, it is emphasized that mixed infection with *H. rodentium* may potentiate disease caused by more pathogenic species such as *H. hepaticus* or *H. bilis* (Myles et al., 2003). In the present study, when it comes to the mouse colonies where sampling was done, no clinical findings were found in 3 facilities infected with *H. hepaticus* in addition to *H. rodentium*, and no notification regarding the clinical signs was received from the Veterinarians in charge of the facility. Therefore, our findings were incompatible with the literature data stating that mixed infections may cause the clinical signs. Additionally, Fox et al. (1994) showed that *H. hepaticus* caused the most severe clinical signs among all enterohepatic *Helicobacter* species, the prevalence of *H. hepaticus* in the mouse colonies examined in the presented study was found to be 27.27% and no clinical sign was encountered in these colonies.

Two different speculations can be developed as to the cause of these incompatibilities stated in the clinical signs. The first of these may be that the laboratory animals in the study have a highly developed immune system, and the second may be that the clinical sign developed by the mouse, which is a species that can reproduce relatively easily, is ignored as a result of focusing only on production in the facilities. In other words, it can be thought that the easy replacement of a colony that has lost its ability to reproduce eliminates the need for detailed clinical observation.

In our study, the prevalence of *Helicobacter* spp. of 90.91% in mice colonies was the highest prevalence rate found in studies on this subject. Because the highest prevalence obtained in studies on this subject in the literature was reported by Taylor et al. (2007) reported as 88%. A similar rate was reported by Bohr et al. (2006) as 87.5% in a study conducted in a facility. In a study conducted in a SPF facility by Jacoby and Lindsay (1998), and a *Helicobacter* prevalence of 10% was revealed. The first study on the prevalence of *Helicobacter* spp. reported the prevalence as 50% (Shames et al., 1995).

According to the results of the University of Missouri Animal Diagnostic and Research Laboratory for 1999-2000, the positivity rate for *Helicobacter* spp was reported as 10.54% (Franklin et al., 2001). In the study conducted by Pritchett-Corning et al. (2009), *Helicobacter* spp. was stated as the most common bacterial agent in mice with a rate of 16.08%.

When the rates obtained on a species basis were compared with previous similar studies; The 90.91% prevalence of *H. rodentium* was the highest in the literature. The rates of this species were 23.4% (Goto et al., 2000), 6% (Taylor et al., 2007), 8% (Wharry and Fox 2006), 15.11% (Franklin et al., 2001), 10% (Myles et al., 2003).

In another study conducted at the species level (Goto et al., 2000), the prevalence of *H. hepaticus* was 25.5% and the prevalence of *H. rodentium* was 23.4% on a colony basis, while the prevalence of *H. bilis*, for which no data could be obtained in the presented study, was 2.1%. was realized as. When these rates are compared with the rates obtained in the presented study, the prevalence of *H. hepaticus* was observed at a similar rate, while in *H. rodentium* it was quite high with a rate of 90.91%.

The first study conducted by Shames et al. (1995) on the prevalence of the *Helicobacter* genus was conducted only for the screening of *H. hepaticus*, and it was reported that *H. hepaticus* was detected in two of the four facilities in the study. This rate was higher than the 27.27% prevalence obtained in mice in the presented study. Another study reporting a higher prevalence rate than the *H. hepaticus* prevalence obtained in the study was conducted by Taylor et al. (2007). Among mice from 34 institutions surveyed in that study, *H. hepaticus* was the most frequently detected species, with a rate of 59%, alone or in combination with other *Helicobacter* species. The only study reported to be lower than the data obtained in the presented study was conducted by Bohr et al. (2006) with a *H. hepaticus* rate of 7.5%. According to the 2002-2003 data of the Swedish National Veterinary Institute, the prevalence of *H. hepaticus* was 42% (Johansson et al., 2006).

The prevalence of *H. typhlonius*, which was reported to be common in the fecal samples of research mice as well as in the sexual organs of three mouse species (Franklin et al., 2001; Scavizzi and Raspa; 2006), was determined to be 72.73% in the presented study. In the study conducted by Taylor et al. (2007), the rate of *H. typhlonius*, which was determined as the second most common species, was stated as 26%. Although this rate represents the highest rate among the literature data, it is significantly lower than

the rate determined in the presented study. While a study conducted between 1999 and 2000 reported a rate of 4.88% for *H. typhlonius* (Franklin et al., 2001), it was reported that 17% of the fecal samples tested in the same laboratory in 2001 and 2002 were positive for *H. typhlonius* (Myles et al., 2003). In another study where a rate of 8% was determined for *Helicobacter* spp., the rate of *H. typhlonius* obtained in total samples was reported as 4% (Bohr et al., 2006).

It seems that survey studies conducted on rats are quite limited compared to those conducted on mice. When it comes to the prevalence of *Helicobacter* spp. in rats, lower rates are observed despite a wide range and relatively high prevalence, as in mice. In a study conducted with the species in question, the presence of *Helicobacter* spp. was reported to be 19% in rat cecum samples scanned using PCR (Wharry and Fox 2006). This rate is considerably lower than the rate obtained in the presented study, 87.5%. In the study, the rates obtained at the species level were *H. rodentium* with 87.5% prevalence and *H. typhlonius* with 12.5% prevalence. While these rates for *H. typhlonius* were similar to the 10% rate reported by Wharry and Fox (2006), the *H. rodentium* rate of 87.5% was found to be significantly higher than the 8% rate determined in the same study.

In a study conducted on rats by Goto et al. (2000), which included only 29.4% of *H. rodentium* positive samples, the colony prevalence was 30%. This rate was lower than the rate determined in the presented study. In the study, where a similar situation to rats was also valid for gerbils, the colony prevalence of *H. hepaticus*, which was positive at a rate of 78%, was 75%. There was a discrepancy between the data obtained in the presented study and the study data in which no genus or species-specific binding was observed except *H. hepaticus* in gerbils. Because in this study, while *H. rodentium* and *H. typhlonius* were among the species that could be detected in the gerbil colony, *H. hepaticus* was not detected.

When the results obtained from all animal species subject to the study are compared on the basis of sampling location (Feces - Colon); While it was observed that *H. hepaticus* was found at a higher rate in the colon samples with 11.11% versus 5.56%, the proportion of *H. typhlonius* was higher in the stool sample with 50 % versus 44.44 %. However, when these results were compared, it was determined that the difference between the two sample results was statistically insignificant ($p>0,05$).

In a study that also included a comparison of sampling locations, it was reported by Cao et al., (2020) that fecal samples may be negative for *Helicobacter* in some cases where the intestines are positive, contrary to the finding we obtained in the presented study. Another study reporting results in favor of the colon between two sampling sites was Matos-Rodrigues et al. (2020). In this study, the *Helicobacter* spp. level was reported as 59.6% in fecal samples and 70.1% in colon samples. However, since the comparison in this study was not conducted on the same animals, the use of the given result for the purpose of evaluation in this direction will not be decisive. The conclusion made by Beckwith et al. (1997), in which the effect of colon and stool samples on the results was found to be insignificant, is parallel to the findings in the presented study. Another study in which a complete compatibility was reported between cultivating made with fecal filtrate and those made from cecum and colon scrapings was Shames et al. (1995).

In a study in which stomach, intestinal and hepatic tissue samples were evaluated to examine the distribution of *Helicobacter* spp. and the relationship of this distribution with the disease; *Helicobacter* DNA was detected at a rate of 85.7% in the fecal samples of 9 mice strains housed in 4 different facilities, and this rate was the highest rate compared to other tissues and samples (Nilsson et al. 2004). Although there was variability at the species level in the presented study, this variability was found to be statistically insignificant, confirming the suitability of fecal samples for screening and the results of Nilsson et al. (2004).

Conclusion and Recommendations

Considering the factors that require the animals to be in full health in order to obtain the closest results to reality from studies conducted on laboratory animals, and to ensure the reliability and reproducibility of the results during the experimental use phase, since the agent in question is quite common, it is recommended that experimental animal facilities should be monitored for this agent and studies should be detailed to create *Helicobacter* free facilities.

The data obtained in this study showed that the use of fecal samples did not have a significant effect on the results when compared to other samples to detect the agent. Therefore, it is thought that there is no harm in sampling using only feces in similar studies, as it is a more practical way.

Etik Komite Onayı: Etik kurul onayı Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Yerel Etik Kurulu 'ndan (Tarih: 12.02.2021, Sayı: 453425) alınmıştır.
Yazar Katkıları: Fikir-N.İ.İ., G.E.; Tasarım- N.İ.İ., G.E.; Denetleme- N.İ.İ., G.E.; Kaynaklar- N.İ.İ., G.E.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi- N.İ.İ., G.E.; Analiz ve/veya Yorum- N.İ.İ., G.E.; Literatür Taraması- N.İ.İ., G.E.; Yazıyı Yazan- N.İ.İ., G.E.; Eleştirel İnceleme- N.İ.İ., G.E.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Bu araştırma Necdet İlker İÇİL'in Doktora tezinden özetlenmiş olup, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Proje No: VTF21029) tarafından desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was obtained from Bornova Veterinary Control Institute (Date: 12.02.2021, Number: 453425)

Author Contributions: Concept - N.İ.İ., G.E.; Design- N.İ.İ., G.E.; Supervision- N.İ.İ., G.E.; Resources- N.İ.İ., G.E.; Data Collection and/or Processing- N.İ.İ., G.E.; Analysis and/or Interpretation- N.İ.İ., G.E.; Literature Search- N.İ.İ., G.E.; Writing Manuscript- N.İ.İ., G.E.; Critical Review- N.İ.İ., G.E.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: This research was summarized from Necdet İlker İÇİL's PhD thesis and supported by Aydın Adnan Menderes University Scientific Research Projects Unit (Project No: VTF21029).

References

- Beckwith, C. S., Franklin, C. L., Hook Jr, R. R., Besch-Williford, C. L., & Riley, L. K. (1997). Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. *Journal of clinical microbiology*, 35(6), 1620-1623. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1620-1623.1997>
- Bohr, U. R. M., Selgrad, M., Ochmann, C., Backert, S., König, W., Fenske, A., Wex, T., & Malfertheiner, P. (2006). Prevalence and spread of enterohepatic *Helicobacter* species in mice reared in a specific-pathogen-free animal facility. *Journal of clinical microbiology*, 44(3), 738-742. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.3.738-742.2006>
- Bracken, T. C., Cooper, C. A., Ali, Z., Truong, H., & Moore, J. M. (2017). *Helicobacter* infection significantly alters pregnancy success in laboratory mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 56(3), 322-329.
- Cao, S., Zhu, C., Feng, J., Zhu, L., Yin, J., Xu, Y., Yang, H., & Zhang, Q. (2020). *Helicobacter hepaticus* infection induces chronic hepatitis and fibrosis in male BALB/c mice via the activation of NF-κB, Stat3, and MAPK signaling pathways. *Helicobacter*, 25(2), e12677. <https://doi.org/10.1111/hel.12677>
- Mähler, M., Berard, M., Feinstein, R., Gallagher, A., Illgen-Wilcke, B., Pritchett-Corning, K., & Raspa, M. (2014). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units. *Laboratory animals*,

- 48(3), 178-192. <https://doi.org/10.1177/0023677213516312>
- Feng, S., Ku, K., Hodzic, E., Lorenzana, E., Freet, K., & Barthold, S. W. (2005). Differential detection of five mouse-infecting helicobacter species by multiplex PCR. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(4), 531-536. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.4.531-536.2005>
- Fox, J. G., Dewhirst, F. E., Tully, J. G., Paster, B. J., Yan, L., Taylor, N. S., Collins, Jr M. J., Gorelick, P. L., & Ward, J. M. (1994). *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice. *Journal of clinical microbiology*, 32(5), 1238-1245. <https://doi.org/10.1128/jcm.32.5.1238-1245.1994>
- Franklin, C. L., Gorelick, P. L., Riley, L. K., Dewhirst, F. E., Livingston, R. S., Ward, J. M., ... & Fox, J. G. (2001). *Helicobacter typhlonius* sp. nov., a novel murine urease-negative *Helicobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(11), 3920-3926. <https://doi.org/10.1128/JCM.39.11.3920-3926.2001>
- Goto, K., Ohashi, H., Takakura, A., & Itoh, T. (2000). Current status of *Helicobacter* contamination of laboratory mice, rats, gerbils, and house musk shrews in Japan. *Current microbiology*, 41, 161-166. <https://doi.org/10.1007/s002840010111>
- Jacoby, R. O., & Lindsey, J. R. (1998). Risks of infection among laboratory rats and mice at major biomedical research institutions. *Illar Journal*, 39(4), 266-271. <https://doi.org/10.1093/ilar.39.4.266>
- Johansson, S. K., Feinstein, R. E., Johansson, K. E., & Lindberg, A. V. (2006). Occurrence of *Helicobacter* species other than *H. hepaticus* in laboratory mice and rats in Sweden. *Comparative medicine*, 56(2), 110-113.
- Matos-Rodrigues, G. E., Masseron, C. C., SILVA, F. J., Frajblat, M., Moreira, L. O., & Martins, R. A. (2020). PCR-based detection of *Helicobacter* spp. in animal facilities of a University in Rio de Janeiro, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202020191517>
- Minitab, LLC. (2021). Minitab. Retrieved from <https://www.minitab.com>
- Myles, M. H., Livingston, R. S., Livingston, B. A., Criley, J. M., & Franklin, C. L. (2003). Analysis of gene expression in ceca of *Helicobacter hepaticus*-infected A/JCr mice before and after development of typhlitis. *Infection and immunity*, 71(7), 3885-3893. <https://doi.org/10.1128/iai.71.7.3885-3893.2003>
- Pathogenicity of *Helicobacter rodentium* in A/JCr and SCID mice. *Comparative medicine*, 54(5), 549-557.
- Neubert, V., Sadek, A., Burell, T., Ralser, A., Erhard, M., Gerhard, M., Seidel K., & Kalali, B. (2022). Validation and improvement of a multiplex PCR method to detect murine *Helicobacter* species in feces samples of mice. *Helicobacter*, 27(3), e12888. <https://doi.org/10.1111/hel.12888>
- Nilsson, H. O., Ouis, I. S., Stenram, U., Ljungh, A., Moran, A. P., Wadström, T., & Al-Soud, W. A. (2004). High prevalence of *Helicobacter* species detected in laboratory mouse strains by multiplex PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and pyrosequencing. *Journal of clinical microbiology*, 42(8), 3781-3788. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.8.3781-3788.2004>
- Pritchett-Corning, K. R., Cosentino, J., & Clifford, C. B. (2009). Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats. *Laboratory animals*, 43(2), 165-173. <https://doi.org/10.1258/la.2008.008009>
- Riley, L. K., Franklin, C. L., Hook Jr, R. R., & Besch-Williford, C. (1996). Identification of murine helicobacters by PCR and restriction enzyme analyses. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(4), 942-946. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.4.942-946.1996>
- Scavizzi, F., & Raspa, M. (2006). *Helicobacter typhlonius* was detected in the sex organs of three mouse strains but did not transmit vertically. *Laboratory animals*, 40(1), 70-79. <https://doi.org/10.1258/002367706775404390>
- Shames, B., Fox, J. G., Dewhirst, F., Yan, L., Shen, Z., & Taylor, N. S. (1995). Identification of widespread *Helicobacter hepaticus* infection in feces in commercial mouse colonies by culture and PCR assay. *Journal of clinical microbiology*, 33(11), 2968-2972. <https://doi.org/10.1128/jcm.33.11.2968-2972.1995>
- Solnick, J. V., & Schauer, D. B. (2001). Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical microbiology reviews*, 14(1), 59-97. <https://doi.org/10.1128/cmr.14.1.59-97.2001>
- Taylor, N. S., Xu, S., Nambiar, P., Dewhirst, F. E., & Fox, J. G. (2007). Enterohepatic *Helicobacter* species are prevalent in mice from commercial and academic institutions in Asia, Europe, and North America. *Journal of clinical microbiology*, 45(7), 2166-2172. <https://doi.org/10.1128/jcm.00137-07>
- Whary, M. T., & Fox, J. G. (2006). Detection, eradication, and research implications of *Helicobacter* infections in laboratory rodents. *Lab animal*, 35(7), 25-36.

Myles, M. H., Livingston, R. S., & Franklin, C. L. (2004).

Exploring Esculetin's Protective Role: Countering Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rat Heart

Eskuletin'in Koruyucu Rolünü Keşfetmek: Sıçan Kalbinde Doksorubisinin Neden Olduğu Oksidatif Stresle Mücadele

Neslihan Öztürk¹
Medine Sibel Karaağaç¹
Esra Nur Yeşilkent¹
Murat İsayıl¹
Hilal Tosun¹
Habibe Karadaş¹
Hamid Ceylan¹
Yeliz Demir²



¹Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Atatürk University, Erzurum, Türkiye

²Department of Pharmacy Services, Nihat Delibalta Göle Vocational High School, Ardahan University, Ardahan, Türkiye



ABSTRACT

Doxorubicin (DOX) and other anthracyclines are potent chemotherapy drugs used against cancer; however, their clinical application is linked to significant and potentially life-threatening cardiotoxicity. Despite extensive research over many years, the available treatment choices are still constrained. DOX is typically believed to primarily affect mitochondria, and the characteristic feature of DOX-induced cardiotoxicity is mitochondrial dysfunction. Esculetin is a coumarin derivative found in nature. It has anti-inflammatory, antioxidant, anti-diabetes and antibacterial properties. This study was designed to investigate the protective effect of esculetin against DOX-induced cardiotoxicity in Sprague-Dawley rats considering the mentioned properties. Cardiotoxicity was induced by administering DOX via intraperitoneal injection at every other day dosage of 5 mg/kg body weight for two consecutive weeks. Rats receiving DOX injections were simultaneously supplemented with esculetin at doses of 50 and 100 mg/kg body weight through intraperitoneal administration over the same period. The investigation, oxidative stress enzymes in heart tissue of rats employed biochemical and molecular methods. The heart tissues were evaluated for the enzyme activity and expression levels of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). The results indicate a substantial decrease in mRNA expression of GPx and CAT in the DOX group compared to the control, but SOD did not show any significant change. The DOX group exhibited a substantial drop in particular specific enzyme activity, specifically SOD, compared to the control group. However, the activity of CAT and GPx enzymes remained unaltered. The current investigation posits that the deleterious impacts of DOX on cardiac tissue may be alleviated by esculetin through the regulation of oxidative stress.

Keywords: Cardiotoxicity, doxorubicin, esculetin, oxidative stress.

ÖZ

Doksorubisin (DOX) ve diğer antrasiklinler kansere karşı kullanılan güçlü kemoterapi ilaçlarıdır; ancak klinik uygulamaları önemli ve potansiyel olarak yaşamı tehdit eden kardiyotoksosite ile bağlantılıdır. Uzun yıllar süren kapsamlı araştırmalara rağmen, mevcut tedavi seçenekleri hala kısıtlıdır. DOX'un tipik olarak öncelikle mitokondriyi etkilediğine inanılır ve DOX kaynaklı kardiyotoksitenin karakteristik özelliği mitokondriyal disfonksiyondur. Eskuletin, doğada bulunan bir kumarin türevidir. Anti-inflamatuar, antioksidan, anti-diyabet ve antibakteriyel özellikleri bulunmaktadır. Bu çalışma, eskuletinin bahsedilen özellikleri göz önünde bulundurularak Sprague-Dawley sıçanlarında DOX kaynaklı kardiyotoksositeye karşı koruyucu etkisini araştırmak üzere tasarlandı. Bu çalışma, bilinen özellikleri göz önünde bulundurularak Sprague-Dawley sıçanlarında DOX kaynaklı kardiyotoksositeye karşı eskuletin'in koruyucu etkilerini araştırmak üzere tasarlandı. Kardiyotoksosite, DOX'un intraperitoneal enjeksiyon yoluyla iki günde bir 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda iki ardışık hafta boyunca uygulanmasıyla indüklendi. DOX enjeksiyonu yapılan sıçanlara aynı süre boyunca 50 ve 100 mg/kg vücut ağırlığı dozlarında intraperitoneal uygulama yoluyla eş zamanlı olarak eskuletin takviyesi yapıldı. Sıçan kalp dokusundaki oksidatif stres enzimlerinin araştırılmasında biyokimyasal ve moleküler yöntemler kullanıldı. Kalp dokularında katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktiviteleri ve ekspresyon seviyeleri değerlendirildi. Sonuçlar, DOX grubunda GPx ve CAT'in mRNA ekspresyonunda kontrole kıyasla önemli bir düşüş olduğunu, ancak SOD'da önemli bir değişiklik göstermediğini ortaya koymaktadır. DOX grubu, kontrol grubuna kıyasla özellikle SOD spesifik enzim aktivitesinde önemli bir düşüş sergilemiştir. Ancak CAT ve GPx enzimlerinin aktivitesi değişmemiştir. Mevcut araştırma, DOX'un kalp dokusu üzerindeki zararlı etkilerinin, oksidatif stresin düzenlenmesi yoluyla eskuletin tarafından hafifletilebileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, eskuletin, kardiyotoksosite, oksidatif stress.

Geliş Tarihi/Received 29.01.2024
Kabul Tarihi/Accepted 12.03.2024
Yayın Tarihi/Publication Date 29.03.2024

Sorumlu Yazar/Corresponding author: Yeliz DEMİR

E-mail: yelizdemir@ardahan.edu.tr

Cite this article: Öztürk N, Karaağaç M. S., Yeşilkent E. N. et al., (2024). Exploring Esculetin's Protective Role: Countering Doxorubicin-Induced Oxidative Stress in Rat Heart. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*, 4(1), 44-52.



Content of this journal is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial 4.0 International License.

Introduction

Doxorubicin (DOX), belonging to the anthracycline family, serves as a powerful chemotherapeutic agent employed in the treatment of diverse solid tumors (including gastrointestinal, brain, breast and ovary) and hematologic malignancies (such as leukemia and lymphoma) (Minotti et al., 2004; Sohail et al., 2021). Despite its effectiveness, up to one-fourth of patients encounter DOX-induced cardiotoxicity, leading to limitations in its clinical application (Rawat et al., 2021). DOX-induced cardiotoxicity manifests clinically in different forms, including chronic phases, early, and acute. Acute cardiotoxicity manifests within minutes to a week after a single dose or course of therapy, characterized by electrocardiographic abnormalities, transient left ventricular dysfunction, and supraventricular arrhythmia. While acute toxicity typically resolves upon discontinuation of medication, it may be linked to cardiomyocyte injury, potentially advancing into chronic or early cardiotoxicity (Qiu et al., 2023).

While there has been extensive research on the mechanisms underlying doxorubicin-induced cardiotoxicity (DIC), the molecular pathogenesis of DIC remains not fully understood. Cardiomyocyte cell death is primarily attributed to three major sources of cell damage: (1) topoisomerase DNA II beta (TOP2 β) poisoning causing double-strand breaks; (2) damage to mitochondria and (3) the overproduction of reactive oxygen species (ROS) leads to damage in proteins, lipids, and DNA. DOX induces a significant reduction in endogenous antioxidant levels, including glutathione and catalase, resulting in redox imbalances and increased oxidative stress (Kong et al., 2022). The myocardium's oxidative damage is probably associated with lower levels of antioxidant enzymes and in comparison to other tissues (Marques et al., 2015). Superoxide dismutase (SOD), serving as a natural scavenger for superoxide radicals in tissues, converts detrimental superoxide radicals into H₂O₂. Catalyzing the oxidation of substrates, peroxidases are located in the carrier's peroxisomes, with iron porphyrin serving as the prosthetic group using H₂O₂ as the electron acceptor, eliminating its toxicity and oxidizing various compounds (Palma et al., 2020). Playing a central role in the clearance of H₂O₂, glutathione peroxidase 1 (GPx1), a principal isoform of GPx, is present in both the cytosol and mitochondria. GPx1-deficient mice exhibited increased susceptibility to DOX-induced damage compared to wild type mice (Lei et al., 2023). Similarly, catalase (CAT) plays a crucial role in the biological defense system, facilitating

the breakdown of H₂O₂ into water and molecular oxygen. This process helps eliminate H₂O₂ from the body, safeguarding cells against H₂O₂ poisoning (Nandi et al., 2019). Upon treatment with DOX, myocardial cells exhibit a diminished capacity for antioxidant enzymes, leading to the accumulation of superoxide anions and H₂O₂. This accumulation triggers oxidative stress, resulting in damage to cardiac myocytes (Shi et al., 2023).

Esculetin is a 6,7-dihydroxy coumarin derivative that occurs naturally in various medicinal plants, including *Fraxinus rhynchophylla*, *Artemisia capillaris*, *Euphorbia lathyris*, *Aesculus hippocastanum* and *Citrus limonia*. It has anticancer, antidiabetes, antioxidant, antiapoptotic, neuroprotective, anti-inflammatory, antibacterial and cardiovascular protective effects and has the potential as a therapeutic drug in non-communicable diseases such as cancer, diabetes, obesity and neurological disorders. Additionally, it has been identified as an inhibitor of ROS production (Kadacol et al., 2016; Zhang et al., 2022).

Due to its bioavailable properties, there is an increasing demand for in vivo analyses and pharmacokinetic studies of esculetin. Therefore, in this study, we investigated the therapeutic potential of esculetin against DOX-induced side effects in rat heart via antioxidant systems.

Materials and Methods

Materials

The study utilized a sample of 48 male Sprague-Dawley rats weighing 180 \pm 20 g, which were acquired from the Medical Experimental Application and Research Center at Atatürk University. The animals were maintained in controlled environments, following a 12-hour light/12-hour darkness photoperiod. The temperature was maintained at 22 \pm 1 $^{\circ}$ C, while the relative humidity was maintained at 60%. Ad-libitum provision of water and nutrition was ensured. After a one-week period of acclimatization, the experimental animals were randomized to six groups in a random manner and were subjected to the following treatments:

Control group: Rats received intraperitoneal injections of normal saline for 14 days.

DOX group: Rats were intraperitoneally injected with DOX (5 mg/kg) every other day for 14 days.

E50 group: Rats received intraperitoneal injections of esculetin (50 mg/kg) for 14 days.

E100 group: Rats were injected intraperitoneally with esculetin (100 mg/kg) for 14 days.

DOX+E50 group: Rats were intraperitoneally injected with DOX, and esculetin was administered 1 hour before the DOX treatment, following the regimen of the DOX and E50 groups.

DOX+E100 group: Rats were injected intraperitoneally with DOX, and esculetin was administered 1 hour before the DOX treatment, following the regimen of the DOX and E100 groups.

After a 14-day period, all rat groups were euthanized under 1/5 xylazine and ketamine anesthesia at a dosage of 1 mg/kg. The heart tissues were expeditiously obtained, rapidly frozen in liquid nitrogen, and thereafter preserved at a temperature of -80°C until subsequent study. The experimental protocols followed the guidelines outlined in the National Research Council's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and received approval from the Atatürk University Local Ethics Council for Animal Experiments and assigned Protocol Number: 2021/4–123.

Methods

RNA isolation and gene expression analysis

Heart tissue total RNA extraction utilized the EcoPURE total RNA kit (EcoTech) following the provided instructions. The Multiskan GO Microplate Spectrophotometer (Thermo Scientific) was employed to assess RNA purity and concentration. Subsequently, cDNA synthesis from total RNA was accomplished using the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) in accordance with the manufacturer's protocol. For gene expression analysis, the SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad) was employed, and Rotor-Gene Q (Qiagen) was used for the determination of gene expression levels. GAPDH served as a housekeeping gene for data normalization. The primer sequences utilized were detailed in a prior study (Yeşilkent and Ceylan, 2022). The $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formula was applied to calculate the relative mRNA expression of the target genes (Karagac and Ceylan, 2023).

Tissue Homogenate Preparation

Heart tissues underwent homogenization in 50 mM phosphate buffer (pH:7.4), supplemented with 1 mM EDTA and 1 mM DTT, utilizing the TissueLyser LT device (Qiagen). Following homogenization, centrifugation at 10000 rpm and 4°C for 30 minutes was carried out (Ceylan et al., 2019).

The resultant supernatant was utilized for biochemical analyses. Protein content in the supernatants was determined using the Bradford method (1976).

Analysis of Antioxidant Enzyme Activities

SOD activity was assessed following the procedure recommended by Sun et al. (1988), with one unit of SOD defined as the quantity inhibiting 50% of nitroblue tetrazolium chloride reduction. CAT activity was determined spectrophotometrically according to the method outlined by Aebi (1984), and one unit of CAT was expressed as the enzyme amount required for hydrogen peroxide decomposition per minute. GPx activity was measured in accordance with the approach reported by Wendel et al. (1981), with one unit of GPx defined as the enzyme amount needed for NADPH oxidation per minute.

Statistical Analysis

The determination of the number of groups and the allocation of rats within each group were established through a thorough G-power analysis. G-power Software 3.1.9.7 (University of Dusseldorf, Germany) was employed for conducting the a priori power analysis, aiming to determine the minimum sample size required for the study. The analysis utilized F tests aligned with the study's design, which involved repeated measures ANOVA with both within and between factors analysis. The study comprised six groups with measurements taken at a single time point. The significance level (α) was set at 0.05, the minimum effect size was specified as 0.25, the correlation among repeated measures was set at 0.5, and the nonsphericity correction was fixed at 1. To achieve a power (1- β error probability) of 0.80, the calculated minimum sample size necessary for statistical significance was determined to be 36 subjects in total, resulting in an actual power of 81.0%.

The normality of numerical variables was assessed utilizing the Shapiro-Wilk test. Results indicated that all variables exhibited a normal distribution ($p > 0.05$). According to the results of this test, it has been determined that the mRNA parameters exhibit a normal distribution ($p > 0.05$).

Each animal and sample were subjected to triple measurements. The statistical analysis involved doing one-way ANOVA and subsequently performing Tukey's post-hoc test using Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA) to compare the findings. Significant differences are denoted by the following criteria: $p > 0.05$ (indicating lack of significance), *: $p < 0.05$ (indicating significance), **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$

Results

When SOD specific enzyme activity results were analyzed, a significant decrease was observed in the E100 and DOX groups compared to the control group, while a significant increase was observed in the E50 group. E100 and DOX+E100 groups were analyzed among themselves, a significant increase was observed (Figure 1). In mRNA expression results, although there was a decrease in DOX group compared to the control, it was not statistically significant. There was a significant increase in the E100 and DOX+E50 groups compared to control (Table 1,2 and Figure 1).

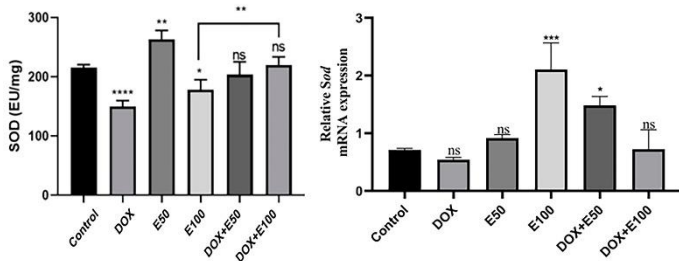


Figure 1. Analyses of the relative gene expression and specific activity for SOD from the heart tissues of rats treated with DOX and E. DOX = Doxorubicin (intraperitoneally 5 mg/kg); E = Esculetin (intraperitoneally 50 mg/kg and 100 mg/kg); Each bar represents the mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates statistically significant difference between the means (ns:p >0.05, *:p < 0.05, **:p < 0.01, ***:p < 0.001 and ****:p < 0.0001)

Şekil 1. DOX ve E ile tedavi edilen ratların kalp dokularından SOD için göreceli gen ekspresyonu ve spesifik aktivite analizleri. DOX = Doksorubisin (intraperitoneal 5 mg/kg); E = Esculetin (intraperitoneal 50 mg/kg ve 100 mg/kg); Her çubuk ortalama \pm SEM'i temsil etmektedir. Yıldız işareti (*) ortalamalar arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir (ns:p >0.05, *:p < 0.05, **:p < 0.01, ***:p < 0.001 ve ****:p < 0.0001)

Table 1. One-way ANOVA test results of *Sod* qPCR data

Table 1. *Sod* qPCR verilerinin tek yönlü ANOVA testi sonuçları

Groups	N	Mean	Std. Error	F	p
Control ^a	8	,78	,009		
DOX ^b	8	,34	,007		
E50 ^c	8	1,00	,009	310,957	,000*
E100 ^d	8	1,20	,008		
DOX+E50 ^e	8	,48	,040		
DOX+E100 ^f	8	,79	,008		

*significant statistical differences were identified when comparing the groups based on DOX-E Cat (p \leq .000).

Table 2. Results of Tukey HSD test of *Sod* qPCR data

Table 2. *Sod* qPCR verilerinin Tukey HSD testi sonuçları

Tukey's multiple comparisons test	Significant
a vs. b	ns
a vs. c	ns
a vs. d	***
a vs. e	*
a vs. f	ns
b vs. c	ns
b vs. d	****
b vs. e	**
b vs. f	ns
c vs. d	***
c vs. e	ns
c vs. f	ns
d vs. e	ns
d vs. f	***
e vs. f	*

a: Control, b: DOX, c: E50, d:E100, e: DOX+E50 f: DOX+E100, ns:p >0.05, *:p < 0.05, **:p < 0.01, ***:p < 0.001 and ****:p < 0.0001

When CAT specific enzyme activity results were analyzed, E50 group showed a significant increase while E100 group showed a significant decrease compared to the control (Figure 2). In mRNA expression results, there was a significant decrease in the DOX group compared to the control. This decrease was regulated in the DOX+E100 combination group. *Cat* gene expression increased in the E100 group (Table 3, 4, Figure 2).

When GPx1 specific enzyme activity results was analyzed, there was a significant decrease in in the E100 group compared to the control group. (Figure 3). There was no statistically significant change in DOX, E50, DOX+E50 and DOX+E100 groups compared to the control. E100 showed a significant decrease compared to E50. In mRNA expression results, the E50 and E100 treated group showed a statistically significant increase in gene expression compared to the control group. Nonetheless, a noteworthy reduction was noted in the group treated with DOX alone. In comparison to the control group, a marked decrease was evident in the group receiving a combination of E50 with DOX, whereas no alteration was observed in the group treated with E100 (Table 5, 6 and Figure 3).

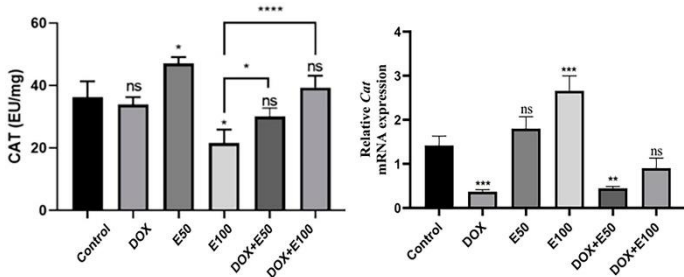


Figure 2. Analyses of the relative gene expression and specific activity for CAT from the heart tissues of rats treated with DOX and E. Each bar represents the mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates statistically significant difference between the means (ns:p>0.05, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 and ****:p<0.0001)

Şekil 2. DOX ve E ile muamele edilen ratların kalp dokularından CAT için göreceli gen ekspresyonu ve spesifik aktivite analizleri. Her çubuk ortalama \pm SEM'i temsil etmektedir. Yıldız işareti (*) ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir (ns:p>0.05, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 ve ****:p<0.0001)

Table 3. One-way ANOVA test results of *Cat* qPCR data

Table 3. *Cat* qPCR verilerinin tek yönlü ANOVA testi sonuçları

Groups	N	Mean	Std. Error	F	p
Control ^a	8	1,42	,04		
DOX ^b	8	,37	,01		
E50 ^c	8	1,76	,06		
E100 ^d	8	2,66	,06	362,223	,000*
DOX+E50 ^e	8	,44	,01		
DOX+E100 ^f	8	,88	,04		

*significant statistical differences were identified when comparing the groups based on DOX-E Cat (p \leq .000)

Table 4. Results of Tukey HSD test of *Cat* qPCR data

Table 4. *Cat* qPCR verilerinin Tukey HSD testi sonuçları

Tukey's multiple comparisons test	Significant
a vs. b	***
a vs. c	ns
a vs. d	***
a vs. e	**
a vs. f	ns
b vs. c	****
b vs. d	****
b vs. e	ns
b vs. f	ns
c vs. d	**
c vs. e	****
c vs. f	**
d vs. e	****
d vs. f	****
e vs. f	ns

a: Control, b: DOX, c: E50, d:E100, e: DOX+E50 f: DOX+E100, ns:p>0.05, *:p<0.05, **:p<0.01, ***:p<0.001 and ****:p<0.0001

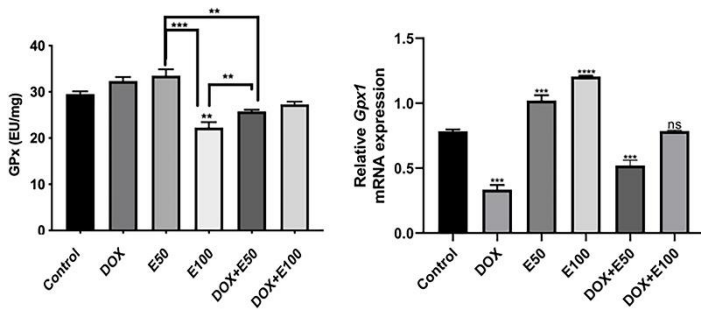


Figure 3. Analyses of the relative gene expression and specific activity for GPx from the heart tissues of rat treated with DOX and E. Each bar represents the mean \pm SEM. Asterisk (*) indicates statistically significant difference between the means (ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$)

Şekil 3. DOX ve E ile muamele edilen ratların kalp dokularından GPx için göreceli gen ekspresyonu ve spesifik aktivite analizleri. Her çubuk ortalama \pm SEM'i temsil etmektedir. Yıldız işareti (*) ortalamalar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkı gösterir (ns: $p > 0.05$, * $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ ve ****: $p < 0.0001$)

Table 5. One-way ANOVA test results of *Gpx1* qPCR data

Tablo 5. *Gpx1* qPCR verilerinin tek yönlü ANOVA testi sonuçları

Groups	N	Mean	Std. Error	F	p
Control ^a	8	,70	,00		
DOX ^b	8	,54	,01		
E50 ^c	8	,90	,01		
E100 ^d	8	2,17	,09	147,831	,000*
DOX+E50 ^e	8	1,46	,03		
DOX+E100 ^f	8	,74	,06		

*significant statistical differences were identified when comparing the groups based on DOX-E Gpx1 ($p \leq .000$).

Table 6. Results of Tukey HSD test of *Gpx1* qPCR data

Tablo 6. *Gpx1* qPCR verilerinin Tukey HSD testi sonuçları

Tukey's multiple comparisons test	Significant
a vs. b	****
a vs. c	***
a vs. d	****
a vs. e	***
a vs. f	ns
b vs. c	****
b vs. d	****
b vs. e	**
b vs. f	****
c vs. d	**
c vs. e	****
c vs. f	***
d vs. e	****
d vs. f	****
e vs. f	***

a: Control, b: DOX, c: E50, d:E100, e: DOX+E50 f: DOX+E100, ns: $p > 0.05$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ and ****: $p < 0.0001$

Discussion

The investigation into the mechanisms of DIC is ongoing, and there is an urgent need for adjuvant therapies that can prevent or alleviate DIC (Jiang et al., 2021). The main mechanisms believed to contribute to DOX-induced cardiotoxicity include a compromised antioxidant defense system and increased production of ROS. Mitochondria, identified as the primary sites of ROS generation, represent crucial targets of DOX (Yang et al., 2020). The myocardium, in contrast to other tissues, exhibits higher susceptibility to oxidative stress, potentially attributed to lower levels of antioxidant enzymes (De Geest and Mishra, 2021). Hence, investigating approaches to natural antioxidant system and safeguard mitochondria is an attractive way to mitigate DIC.

Natural products emerge as promising candidates for novel drug development, and in this study, esculetin was recognized as a protective agent against cardiotoxicity, partially by activating the fundamental antioxidant signaling pathway. Esculetin (6,7-dihydroxycoumarin) displays diverse pharmacological effects, encompassing anti-oxidative properties, the inhibition of anti-atherogenic activity and human leukemia cell growth (Yun et al., 2011). Additionally, it has shown efficacy in restraining tumor growth in cell cultures and a mouse tumor xenograft model in living organisms (Lee et al., 2013).

In this study, we investigated the impact of esculetin on DOX-induced cardiotoxicity and explored the underlying mechanisms of the synergistic cardiotoxic effects associated with combined esculetin and DOX treatment. Mitochondria plays a central role as the primary target organelle in DOX-induced toxicity within cardiomyocytes (Shi et al., 2018). Notably, DOX exhibits a higher concentration within mitochondria compared to its simultaneous serum concentration, based on clinical data (Tadokoro et al., 2023). DOX utilizes enzymatic-related mechanisms in the mitochondrial respiratory chain, leading to the accumulation of ROS, which is a primary factor in DOX-induced cardiotoxicity (Jiang et al., 2022). Childs et al. (2002) found that when DOX triggers the generation of ROS in mitochondria, it causes the mitochondrial membrane potential to decrease and the release of cytochrome C.

Heart cells, known for their diminished antioxidant enzyme activity, are recognized as a principal focus of oxidative stress induced by DOX (Shi et al. 2023). In our study, exposing the heart to DOX resulted in heightened ROS production and inhibited the activities of CAT, SOD, and GPx, all of which play crucial roles in antioxidant defense. SOD and CAT levels in rat heart tissue experienced a remarkable decrease upon DOX treatment, but the application of esculetin significantly raised these enzyme levels. To conclude, esculetin played a crucial role in reducing DOX-induced oxidative stress in cardiac tissue.

Considering their mechanisms, antioxidant supplements could play a crucial role in cardio-oncology signaling. Flavonoids emerge as a potentially effective category of herbal medications to mitigate DOX cardiotoxicity, given their iron-chelating properties, antioxidant effects, carbonyl reductase-inhibitory attributes and inhibition of lipid peroxidation (Abdelghffar et al., 2021).

Studies in the literature have explored the impact of phenolic compounds on both the induction and cardiotoxicity associated with DOX. Quercetin, a flavonoid glycoside, has been studied for its preventive impacts on heart-related disorders and cardiac damage. Several studies have documented its protective role against DOX-induced cardiomyopathy, attributing the expression and the subsequent improvement in antioxidant defense, including SOD and CAT (Abdelghffar et al., 2021). Another flavonoid glycoside, apigenin, has been reported to reduce blood levels of lactate dehydrogenase and creatine kinase myocardial band in a myocardial ischemia rat model. Its protective effects are associated with the inhibition of NF- κ B activation, leading to the suppression of pro-inflammatory cytokines (Ojha et al., 2016). Furthermore, the delivery of apigenin to adult rat cardiomyocytes resulted in enhanced cell survival when exposed to DOX. This effect was attributed to many mechanisms, including the mitigation of lipid peroxidation, quenching of ROS, and avoidance of myocyte necrosis (Psotová et al., 2004). Berberine pretreatment exhibited significant enhancements in GPx, and CAT, SOD activities, while concurrently reducing MDA levels. Furthermore, it ameliorated both electrocardiogram patterns and histopathological alterations in the myocardium of DOX-treated rats (Wu et al., 2019). The research conducted by Dai and colleagues (2018) delves into the potential of octreotide (OCT) in counteracting DOX-induced cardiac toxicity in rats. The cardiac homogenate of the OCT group revealed elevated activities of CAT, SOD, and GSH compared to the DOX group. Notably, a substantial reduction in MDA activity and ROS levels was observed in the OCT group in comparison with the DOX group ($p < 0.05$).

Conclusion

In summary, herbal products present valuable opportunities for drug discovery in preventing and treating DIC. Our study, for the first time, showcased the cardioprotective effects of esculetin against DIC. Esculetin demonstrated the ability to protect mitochondria and alleviate oxidative stress through the antioxidant signaling pathway. Esculetin shows potential in reducing the harmful effects of DOX on the heart and might be used as an additional medication in cancer treatment.

Etik Komite Onayı: Etik kurul onayı Atatürk Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (2021/4–123) alınmıştır.

Yazar Katkıları: Tasarım ve Denetleme- H.C., Y.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi – N.Ö., MS. K., EN. Y., M.I., H.T.; Analiz ve/veya Yorum – N.Ö., MS. K., EN. Y., M.I., H.T.; Literatür Taraması – H.C., Y.D.; Yazıyı Yazan – H.C., Y.D.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan etmiştir.

Finansal Destek: Bu çalışma Ardahan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Destek Numarası: 2021-003).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Atatürk University (Protocol Number: 2021/4–123).

Author Contributions: Design and Supervision- H.C., Y.D.; Data Collection and/or Processing- N.Ö., MS. K., EN. Y., M.I., H.T.; Analysis and/ or Interpretation – N.Ö., MS. K., EN. Y., M.I., H.T.; Literature Search H.C., Y.D.; Writing Manuscript – H.C., Y.D.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Conflict of Interest: The authors have no conflicts of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was funded by Ardahan University Scientific Research Project Coordination Unit (Grant Number: 2021-003).

References

- Abdelghffar, E. A., Obaid, W. A., Elgamal, A. M., Daoud, R., Sobeh, M., & El Raey, M. A. (2021). Pea (*Pisum sativum*) peel extract attenuates DOX-induced oxidative myocardial injury. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 143, 112120.
- Aebi H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121–126.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Ceylan, H., Budak, H., Kocpinar, E. F., Baltacı, N. G., & Erdogan, O. (2019). Examining the link between dose-dependent dietary iron intake and Alzheimer's disease through oxidative stress in the rat cortex. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 56, 198–206.
- Childs, A. C., Phaneuf, S. L., Dirks, A. J., Phillips, T., & Leeuwenburgh, C. (2002). Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio. *Cancer Research*, 62(16), 4592–4598.
- Dai, G. F., Wang, Z., & Zhang, J. Y. (2018). Octreotide protects doxorubicin-induced cardiac toxicity via regulating oxidative stress. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(18), 6139–6148.
- De Geest, B., & Mishra, M. (2022). Role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Antioxidants*, 11(4), 784.
- Jiang, Q., Chen, X., Tian, X., Zhang, J., Xue, S., Jiang, Y., Liu, T., Wang, X., Sun, Q., Hong, Y., Li, C., Guo, D., Wang, Y., & Wang, Q. (2022). Tanshinone I inhibits doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating Nrf2 signaling pathway. *Phytomedicine*, 106, 154439.
- Kadakol, A., Sharma, N., Kulkarni, Y. A., & Gaikwad, A. B. (2016). Esculetin: A phytochemical endeavor fortifying effect against non-communicable diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1442–1448.
- Karagac, M. S., & Ceylan, H. (2023). Neuroprotective potential of tannic acid against neurotoxic outputs of monosodium glutamate in rat cerebral cortex. *Neurotoxicity Research*, 41(6), 670–680.
- Kong, C. Y., Guo, Z., Song, P., Zhang, X., Yuan, Y. P., Teng, T., Yan, L., & Tang, Q. Z. (2022). Underlying the Mechanisms of Doxorubicin-Induced Acute Cardiotoxicity: Oxidative Stress and Cell Death. *International Journal of Biological Sciences*, 18(2), 760–770.
- Lee, S. Y., Lim, T. G., Chen, H., Jung, S. K., Lee, H. J., Lee, M. H., Kim, D. J., Shin, A., Lee, K. W., Bode, A. M., Surh, Y. J., & Dong, Z. (2013). Esculetin suppresses proliferation of human colon cancer cells by directly targeting β -catenin. *Cancer Prevention Research*, 6(12), 1356–1364.
- Lei, F. J., Chiang, J. Y., Chang, H. J., Chen, D. C., Wang, H. L., Yang, H. A., Wei, K. Y., Huang, Y. C., Wang, C. C., Wei, S. T., & Hsieh, C. H. (2023). Cellular and exosomal GPx1 are essential for controlling hydrogen peroxide balance and alleviating oxidative stress in hypoxic glioblastoma. *Redox Biology*, 65, 102831.
- Marques, G. L., Neto, F. F., Ribeiro, C. A., Liebel, S., de Fraga, R., & Bueno, R. daR. (2015). Oxidative Damage in the Aging Heart: an Experimental Rat Model. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 9, 78–82.

- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological Reviews*, 56(2), 185-229.
- Nandi, A., Yan, L. J., Jana, C. K., & Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 9613090.
- Ojha, S., Al Taei, H., Goyal, S., Mahajan, U. B., Patil, C. R., Arya, D. S., & Rajesh, M. (2016). Cardioprotective potentials of plant-derived small molecules against doxorubicin associated cardiotoxicity. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
- Palma, F. R., He, C., Danes, J. M., Paviani, V., Coelho, D. R., Gantner, B. N., & Bonini, M. G. (2020). Mitochondrial Superoxide Dismutase: What the Established, the Intriguing, and the Novel Reveal About a Key Cellular Redox Switch. *Antioxidants and Redox Signaling*, 32(10), 701-714.
- Psotová, J., Chlopčíková, S., Miketová, P., Hrbáč, J., & Simánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes. Part III. Apigenin, baicalein, kaempferol, luteolin and quercetin. *Phytotherapy Research*, 18(7), 516-521.
- Qiu, Y., Jiang, P., & Huang, Y. (2023). Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms, monitoring, and prevention. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 10, 1242596.
- Rawat, P. S., Jaiswal, A., Khurana, A., Bhatti, J. S., & Navik, U. (2021). Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 139, 111708.
- Shi, S., Chen, Y., Luo, Z., Nie, G., & Dai, Y. (2023). Role of oxidative stress and inflammation-related signaling pathways in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Cell Communication and Signaling*, 21(1), 61.
- Shi, W., Deng, H., Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, X., & Cui, G. (2018). Mitochondria-Targeting Small Molecules Effectively Prevent Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin. *Molecules*, 23(6), 1486.
- Sohail, M., Sun, Z., Li, Y., Gu, X., & Xu, H. (2021). Research progress in strategies to improve the efficacy and safety of doxorubicin for cancer chemotherapy. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 21(12), 1385-1398.
- Sun, Y., Oberley, L. W., & Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34(3), 497-500.
- Tadokoro, T., Ikeda, M., Ide, T., Deguchi, H., Ikeda, S., Okabe, K., Ishikita, A., Matsushima, S., Koumura, T., Yamada, K. I., Imai, H., & Tsutsui, H. (2023). Mitochondria-dependent ferroptosis plays a pivotal role in doxorubicin cardiotoxicity. *JCI insight*, 8(6), e169756.
- Wendel A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, 77, 325-333.
- Wu, Y. Z., Zhang, L., Wu, Z. X., Shan, T. T., & Xiong, C. (2019). Berberine Ameliorates Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity via a SIRT1/p66Shc-Mediated Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2150394.
- Yang, Y., Sun, B., Zuo, S., Li, X., Zhou, S., Li, L., Luo, C., Liu, H., Cheng, M., Wang, Y., Wang, S., He, Z., & Sun, J. (2020). Trisulfide bond-mediated doxorubicin dimeric prodrug nanoassemblies with high drug loading, high self-assembly stability, and high tumor selectivity. *Science advances*, 6(45), 1725.
- Yesilkent, E. N., & Ceylan, H. (2022). Investigation of the multi-targeted protection potential of tannic acid against doxorubicin-induced kidney damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 365, 110111.
- Yun, E. S., Park, S. S., Shin, H. C., Choi, Y. H., Kim, W. J., & Moon, S. K. (2011). p38 MAPK activation is required for esculetin-induced inhibition of vascular smooth muscle cells proliferation. *Toxicology In Vitro*, 25(7), 1335-1342.
- Zhang, L., Xie, Q., & Li, X. (2022). Esculetin: A review of its pharmacology and pharmacokinetics. *Phytotherapy research*, 36(1), 279-298.

Journal of Laboratory Animal Science and Practices

Hakem Listesi (2023 Yılı) / Reviewer List (Year 2023)

Ahmet İNAL	Kadir ÖNK
Ahmet TOPAL	Muhammet Bahaeddin DÖRTBUDAK
Andy BEARE	Mehmet Cemal ADIGUZEL
Arzu ARI	Muhammet İrfan KURUDİREK
Betül APAYDIN YILDIRIM	Pelin Fatoş POLAT DİNÇER
Betül Çiçek	Seçil Nazife PARLAK
Ceren SUVEREN ERDOĞAN	Seda YAKUT
Cihan GÜR	Sema ALAŞAHAN
Demet ÇELEBİ	Semin GEDİKLİ
Deniz KARAKCI	Volkan GELEN
Emin ŞENGÜL	Zerrin KUTLU
Feyyaz KAYA	
Gökhan İPEKOĞLU	
Hüsamettin EKİCİ	

