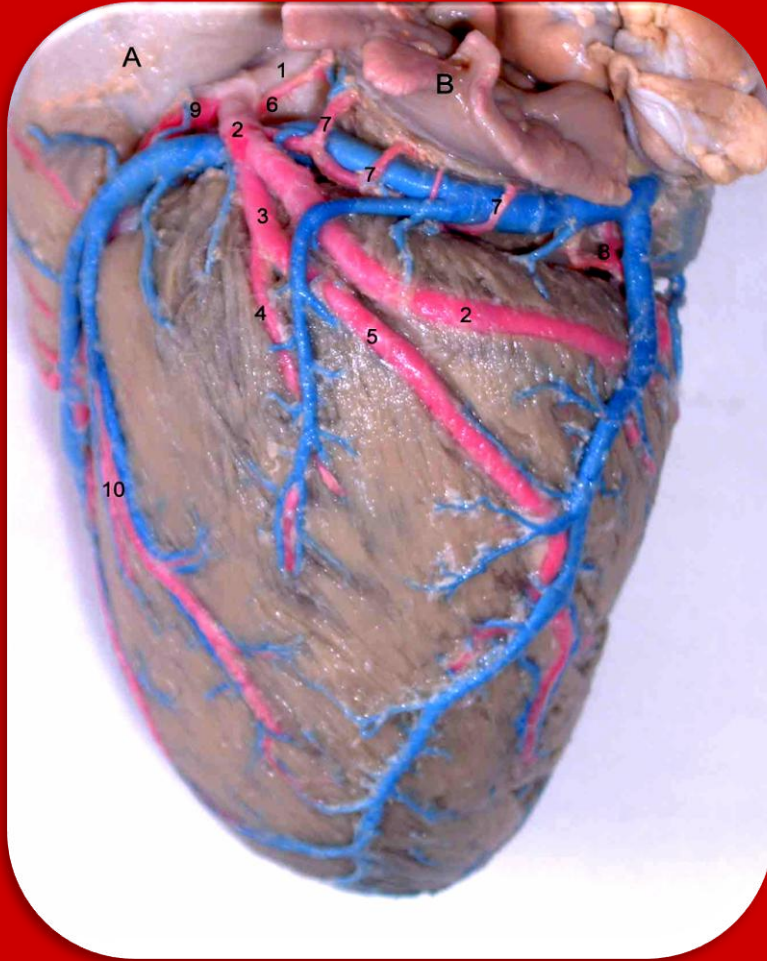




Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi

Atatürk University Journal of Veterinary Sciences



*Kıvırcık Koyunlarında Koroner Arterler Üzerine Makroanatomik Bir
Çalışma, Doğruer ve Özmen*

Yıl/Year: 2012

Cilt/Volume: 7

Sayı/Number: 1



ISSN 1306 – 6137

*Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi*

*Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences*

**Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Adına
Sahibi / Owner**

Prof. Dr. Mustafa ATASEVER
Dekan / Dean

Editör / Editor-in-Chief

Doç. Dr. Nejdet ŞİMŞEK

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Doç. Dr. Ali KARADENİZ
Yrd. Doç. Dr. Emre KARAKUŞ
Yrd. Doç. Dr. Ertan ORUÇ

İngilizce Danışmanı / English Adviser

Doç. Dr. Ömer UÇAR

Dizgi / Typesetter

Yrd. Doç. Dr. İsmail CAN

Web Tasarım / Web Designer

Arş. Gör. Adem KARA

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., ulusal hakemli bir dergi olup **Nisan, Ekim ve Aralık** aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Bu dergi, **CAB Abstract, TÜBİTAK-ULAKBİM, CABI full text, Google Scholar** ve **Türkiye Atıf Dizini** tarafından taranmaktadır.

Atatürk University J. Vet. Sci., is a refereed national journal, is published tri-annually in April, October and December. This journal is abstracted in CAB Abstract, TÜBİTAK-ULAKBİM, CABI full text, Google Scholar and Türkiye Citation Index.

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü
25240, Kampüs/Erzurum-TÜRKİYE
Tel : +90 442 2360880, Fax: +90 442 2360881
E-posta: atavetderg@hotmail.com; vetdergisi@atauni.edu.tr

- **Hatice Mahur TURAN, Emre ÖZAN, Harun ALBAYRAK, Abdullah CAVUNT, Yavuz Selim MEMİŞ.** Efficiency of Three PPRV Vaccines Commercially Available in Turkey (*Türkiye`de Ticari Olarak Kullanılan Üç Farklı PPRV Aşısının Etkinliği*) 1-6
- **Yıldırım KALKAN, Levent TÜMKAYA, Habib BOSTAN, Yakup TOMAK, Durdu ALTUNER, Orhan BAŞ, Orhan Ünal ZORBA, Hakkı UZUN.** Yetişkin Sıçanlarda Testis Hücreleri ve Kalsinörin Immunopozitifliği Üzerine Ketaminin Etkileri: Bir Immunohistokimyasal ve Histopatolojik Çalışma (*Effects on Calcineurin Immunopositivity and Testes Cells of Ketamine in Adult Rat: An Immunohistochemistry and Histopathological Study*). 7-17
- **Mehmet AYDIN, Uğur Yücel KESİCİ.** Ülkemizdeki Deniz Memelileri Gösteri Merkezlerinin Durumu (*Present Condition of Marine Mammals Show Centers of Turkey*). 19-25
- **Emre OZAN, Hatice Mahur TURAN, Harun ALBAYRAK, Abdullah CAVUNT.** Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey (*Samsun İlindeki Küçük Ruminantlarda Pestivirus, Mavidil Virusu ve Küçük Ruminant Vebası Virusunun Serolojik Olarak Belirlenmesi*). 27-33
- **Azime DOĞRUER, Erdal ÖZMEN.** Kıvrıkcık Koyunlarında Koroner Arterler Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma (*A Macroanatomical Study on the Coronary Arteries of Kıvrıkcık Sheep*). 35-45
- **Hurrem Turan AKKOYUN, Nursel DOSTBİL.** Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması (*Investigations upon the Likelihood of Transformation and Resistance of Na-Tellurite Originated Plasmide at the Soil Bacteria Isolated from Natural Environment*). 47-52
- **Ahmet TOPAL, Fikret ÇELEBİ.** Hiperisin'in İzole Edilmiş Sıçan Midesinde Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi (*Effects of Hypericin on Gastric Acid Secretion in Isolated Rat Stomach*).**Düzeltilme** 53-54

Olgu Sunumu / Case Report

- **Hayrettin ÇETİN, Ömer KORKMAZ, Mehmet Osman ATLI.** Bir Koyunda Sekonder Abdominal Gebelik (*Secondary Abdominal Pregnancy in an Ewe*). 55-58

Derlemeler / Reviews

- **Ahmet Kürşat AZKUR, Muhammet Eren ASLAN.** Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları (*Flow Cytometry and its Applications for Veterinary Medicine*) 59-66
- **Mehmet Osman ATLI, Mehmet KÖSE, Ercan KURAR, Aydın GÜZELOĞLU, Ahmet SEMACAN.** Kısraclarda Erken Gebelik Tespiti (*Early Detection of Pregnancy in Mares*). 67-75

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 2012; 7(1)

Bu Sayının Hakem ve Danışman Listesi / List of Referees and Advisors for This Issue

- Prof. Dr. Ahmet SEMACAN, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Prof. Dr. Cahit KALKAN, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Prof. Dr. Gürsoy AKSOY, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Prof. Dr. Seval DAĞALP, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. Ahmet GÜMEN, Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. Ali KARADENİZ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. İbrahim AYDIN, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. Mehmet KALE, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. Nejdet ŞİMŞEK, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Doç. Dr. Nilüfer SABUNCUOĞLU ÇOBAN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Yrd. Doç. Dr. Akın KIRBAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Yrd. Doç. Dr. İbrahim SÖZDUTMAZ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
- Yrd. Doç. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

* Hakem listesi isim ve akademik ünvana göre alfabetik olarak sıralanmıştır.



Efficiency of Three PPRV Vaccines Commercially Available in Turkey

Hatice Mahur TURAN¹, Emre ÖZAN², Harun ALBAYRAK^{1✉},

Abdullah CAVUNT², Yavuz Selim MEMİŞ³

1. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ondokuz Mayıs University, Samsun.
2. Virology Laboratory, Veterinary Control and Research Institute, Samsun.
3. Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Department of Animal Health, Samsun.

Abstract: The efficiencies of three different commercially available Peste des petits ruminants virus (PPRV) vaccines were evaluated on the basis of the antibody response surveyed by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) and the results were confirmed by virus neutralization test (VNT) in sheep and goats. The study was conducted during the period from June 2010 to January 2011 to determine the antibody response against three different commercially available homologous PPR (Nigeria 75/1) vaccines. A total of 150 sheep and 50 goats of both genders were divided into three groups, as Group 1, 2 and 3. Each group was inoculated one out of three vaccines. A total of three samples of were collected three times from all the groups at pre- (day zero) and post-vaccination (18th days and 8th months). The results indicate that treated goats developed antibodies after the vaccination, while the most of sheep did not have any antibodies for PPRV.

Key words: Goat, PPRV, Sheep, Turkey, Vaccine.

Türkiye`de Ticari Olarak Kullanılan Üç Farklı PPRV Aşısının Etkinliği

Özet: Koyun ve keçilerde ticari üç farklı küçük ruminant vebası virus (PPRV) aşısının etkinliği antikor cevabına dayalı bir metot olan competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) ile kontrol edildi ve sonuçlar virus nötralizasyon testi (VNT) ile doğrulandı. Söz konusu çalışma, Haziran 2010 ile Ocak 2011 tarihleri arasında yapıldı. Her iki cinsiyeti içeren 150 koyun ve 50 keçiden oluşan çalışma grubu, Grup 1, 2 ve 3 olmak üzere üç gruba ayrıldı. Her gruba farklı bir aşı uygulaması yapıldı. Serum örnekleri aşılama öncesi (0. gün) ve aşılama sonrasında (18. gün ve 8. ay) olmak üzere toplam üç kez alındı. Araştırma sonuçlarına göre, keçilerde PPRV'ye karşı antikor cevabı şekillenirken, koyunların çoğunda antikor cevabınının şekillenmediği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Keçi, PPRV, Koyun, Türkiye, Aşı.

INTRODUCTION

Peste des petits ruminants (PPR) disease is a severe fast spreading disease of mainly domestic small ruminants caused by PPR virus (PPRV) that belongs to morbillivirus genus of *Paramyxoviridae* family. Highly pathogenic viruses such as rinderpest, canine distemper, measles and marine mammal viruses are closely related members of the genus (Barrett et al., 2005). The disease is characterized by sudden onset of depression, fever, discharges from the eyes and nostrils, sores in the mouth, disturbed breathing and cough, foul smelling diarrhoea and death (Diallo, 1988; Albayrak and Alkan, 2009; Ozmen et al., 2009).

The disease is considered as one of the major threats to small ruminant production in its endemic regions (Anonymous, 2009). Until the mid-1980s, PPR was regarded as a disease of West African countries. From that period onwards, the known distribution of PPR has progressed towards the Middle East, Iran, the Indian sub-continent, Turkey and, recently some countries in Central Asia (Kwiatk et al., 2007; Albayrak and Alkan, 2009).

As there is no suitable antiviral therapeutic schedule to protect the animals against this disease, vaccination is the only option for controlling the PPR. The usual practice in Turkey is to use homologous vaccines. The main disadvantage of this vaccine, like other Morbillivirus vaccines, is its poor thermal stability (Siddique et al., 2006). A campaign for PPR vaccination commenced, by Turkish government, in 2010, but some of the sheep have been diagnosed with PPR, even though they had been vaccinated previously. This brought up the question of the efficiency of vaccines. Official Veterinary staff performed all the vaccine administrations (unpublished data). The study was conducted in Samsun, a city in Blacksea region (41° 17' N, 36° 20' E). Previous studies have showed that the disease is commonly seen in this region (Albayrak and Alkan, 2009).

Therefore, the aim of this study was to investigate the efficiency of three commercial PPR vaccines in goats and sheep flocks in northern Turkey.

MATERIALS and METHODS

Animals

In this study, local flocks, consisting of both sheep and goats, were used. Overall, 200 animals were involved in the study (150 sheep and 50 goats). The mean age of the animals at the beginning of the study was 36 months (min.-max.=1-5 years). The breeds of sheep were the local Karayaka breed, while goats were Saanen and hair goat breeds.

Immunisation of Animals

The vaccination of animals was carried out on a private farm in a village of Samsun, Turkey. The immune response of PPR vaccine was studied on 150 sheep and 50 goats on the 18th day. However, due to the reasoning of farm owner selling out some of the animals during the period between the first and second studies, the second study was performed on a lesser sheep population (n=73). Both sheep and goats were divided into three groups according to the vaccine types used. Group 2 and 3 contained 50 sheep and 20 goats while group 1 contained 50 sheep and 10 goats. The flocks of sheep and goat were vaccinated at different times. All the flocks were vaccinated with same serial, but different vial of vaccine given at the same time. There are only three PPR vaccines commercially available in Turkey. All the three vaccines are lyophilised vaccines containing attenuated PPR vaccine strain Nig 75/1 grown on the Vero cell line. While the vaccine used for the 1st and 2nd group had a minimum of 10^{2.5} TCID₅₀ (tissue culture infected dose) of the virus for each dose, the vaccine given in the 3rd group had it at 10^{3.0} TCID₅₀ dose. All the three vaccines contained 10 % sucrose and 5 %

lactalbumin hydrolysate. Blood samples of each animal were collected prior to the vaccination and on the 18th day after vaccination and lesser number of animals were also sampled on the 8th month after vaccination. Blood samples were taken from the *V. jugularis*. Blood tubes (without EDTA) were centrifuged at 3,000 × *g* for 10 min, and the samples were transferred into sterile tubes and stored at –20 °C until being used.

C-ELISA

Samples were examined for hemagglutinin protein (H) of PPRV using specific PPRV monoclonal antibody-based c-ELISA (Biological Diagnostic, UK). The ELISA was performed according to the manufacturer's instructions, as described elsewhere (Anderson et al., 1991). Briefly, we used 50 ml of each reagent in each step of the test. Incubation was performed at 37 °C for 1 h on an orbital shaker (Heidolph Titramax, Kelheim, Germany) in each step, and the plates were washed three times after each. Microtiter plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with 1/100 dilutions of PPRV antigens in phosphate-buffered saline (pH 7.4). Then, 1:5 dilutions were made and control sera added. The dilution was made by adding 10 ml of serum following the addition of 40 ml of blocking buffer (0.1 % v/v Tween-20 and 0.3 % v/v negative anti-PPRV serum). Afterwards, 50 ml of a 1/100 dilution of the reconstituted pre-titrated monoclonal antibodies (Mab) was added. Mab control wells received 50 ml at the same concentration in addition to 50 ml blocking buffer. Conjugate control wells received 100 ml blocking buffer and 50 ml of 1/1000 dilution of rabbit anti-mouse horseradish peroxidase conjugate. Freshly prepared orthophenylenediamine (OPD) containing 0.004 % v/v hydrogen peroxide was added, and plates were incubated at room temperature for 10 min before the reaction was terminated by adding 50 ml 1M sulphuric acid. The plates were read by a spectrophotometer (Biotech ELX50, CA, USA) at 492 nm. Optical Density (OD) values were calculated to

determine percentage inhibition of a given Mab using the formula, as follows: % inhibition=100 X (OD of sample/OD of control).

Virus Neutralisation Test (VNT)

A field isolate of PPRV (Lineage 4) was obtained from the Virology Department of the Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University (GenBank no. AF384687.1); a Vero cell line maintained with Dulbecco's Modified Essential Medium containing 5 % fetal calf serum was used for virus propagation and neutralisation tests. The VNT was performed in 96-well plates. All sera samples were mixed in equal volumes of 100 TCID₅₀ dilution of PPRV in four wells for each sample and were incubated for one h at 37 °C. Then, the cell suspension was added into each well. The plates were observed daily for up to five days for morphological changes using an inverted microscope (Olympus CKX 41, Japan). Positive control serum was PPR antiserum (CIRAD-EMVT, Montpellier, France).

RESULTS

In sheep, in all three groups, few sheep had antibodies for PPRV prior to vaccination [2/50 in group 1 and 3, 1/50 in group 2]. On the 18th day post-vaccination, antibodies were detected from only five additional animals in the 1st group. In the 2nd group however, this number was only two, while 19 animals had antibodies in the 3rd group. At the 8th month post-vaccination, six out of 28 sheep in the 1st group and four out of 22 sheep in the 2nd group had antibodies and, as expected, the highest number of animals with the antibodies was in the 3rd group, with 10 out of 23.

In goats, only one goat had antibodies prior to the vaccination in the 3rd group. However, on the 18th day post-vaccination, all goats developed antibodies in the 2nd and 3rd groups, while seven out of 10 goats had antibodies in the 1st group. At the 8th month post-vaccination, antibodies were detected

from all goats from the 2nd and 3rd groups, as expected, and in the 1st group only one goat did not have antibodies (Table 1). All positive serum samples were double-checked and confirmed by the VNT.

DISCUSSION

Many serologic test methods have been used for the diagnosis of PPR, such as c-ELISA and VNT (Gür and Albayrak, 2010). The c-ELISA has a higher specificity (98.4 %) and sensitivity (92.4 %) than the VNT. The sensitivity of c-ELISA for PPRV infection increases up to 95.4 %, if the target population is not vaccinated (Singh et al., 2004).

The results of this study clearly indicated that the three homologous PPRV vaccines commercially used in Turkey do not constitute antibody response in all sheep, except for goat flocks. Similar studies have been conducted previously on the efficiency of the PPRV vaccines that were the counterparts of

vaccines used in our study. However, the results of those studies are not consistent with the present results. For instance, a study from Pakistan showed that sheep and goats both had 100 % of antibody response to the vaccine (Intizar et al., 2009). According to another study from India, the PPR vaccine could have protected its potency for 14 days even though it was kept in room temperature and it could still have caused antibody response in goats (Siddique et al., 2006). Our study revealed some possibilities such that there could be noticeable differences in protective potential of the vaccines from different serials and vials. Moreover, differences between the antibody response in sheep and goats introduced the idea of a further study warranted in this area. Undoubtedly, the result of seroprevalance studies might be influenced by many other factors, such as the number of animals sampled, their age, time of sampling, conditions of care and feeding, individual differences and so on.

Table 1. The proportion of the number of animals with antibody response against the number of vaccinated animals
Tablo 1. Antikor cevabı şekillenen hayvanların aşılanan hayvanlara oranı

	Group 1			Group 2			Group 3		
	Day 0 (%)	Day 18 (%)	8 th month (%)	Day 0 (%)	Day 18 (%)	8 th month (%)	Day 0 (%)	Day 18 (%)	8 th month (%)
Goats	0/10 (-)	7/10 (70.00)	9/10 (90)	0/20 (-)	20/20 (100)	20/20 (100)	1/20 (5.00)	20/20 (100)	20/20 (100)
Sheep	2/50 (4.00)	7/50 (14)	6/28 (21.42)	1/50 (2.00)	2/50 (4.00)	4/22 (18.18)	2/50 (4.00)	19/50 (38)	10/23 (43.47)
Total	2/60 (3.33)	14/60 (23.33)	15/38 (39.47)	1/70 (1.42)	22/70 (31.42)	24/42 (57.14)	3/70 (4.28)	39/70 (55.71)	30/43 (69.76)

Although the vaccines evaluated in this study had higher immunising doses ($10^{2.5}$ and $10^{3.0}$ TCID₅₀) than the minimum effective dose for PPRV vaccine ($10^{0.8}$ TCID₅₀), the present trials did not lead to efficient antibody response in sheep flocks.

As with all members of the family *Paramyxoviridae*, PPRV is highly heat-sensitive and this is a serious drawback to the efficient use of the live attenuated vaccine in endemic areas, having hot climatic environments. In addition, these regions

usually have poor infrastructures and it is thus difficult to maintain a cold chain to ensure the preservation of vaccine potency. Our vaccine trials were carried out in goat flock in April and in sheep flock in June. Due to seasonal differences, the results of this study may have been affected, more or less, by the climatic conditions. Because of heat-sensitive feature of lyophilised PPR live vaccines, it could be inactivated during the vaccination. This shortcoming nature of the vaccine was overcome by

Worwall et al. (2001) through the development of a thermo-tolerant vaccine, freeze-dried in the presence of a cryoprotectant containing trehalose. Under these production conditions, the vaccine could remain stable at 45 °C for 14 days with a minimal level of loss of its potency. The PPR control will benefit greatly from the use of this thermostable form of the attenuated vaccine. Recently, a similar vaccine has been produced in India, using a local strain of PPRV (Sarkar et al., 2003). Moreover, our results indicate that, PPR vaccines commercially available in the market have not being adequately controlled by responsible institutions in Turkey. Therefore, desired vaccination results against the PPR could not be achieved for the time being.

Additionally, there have been several studies on developing new PPRV vaccines. It was recently reported that the hemagglutinin (H) and fusion (F) protein genes of several morbilliviruses could be expressed in various vector systems and they might be used as effective sub-unit vaccines (Diallo et al., 2007). Furthermore, a new study is in progress on a DIVA vaccine (Baron et al., 2011), which would be a further advantage for the endemic areas like our country. As highlighted by Diallo et al. (2007), the current vaccination against the rinderpest virus in cattle has been ceased that makes the PPRV infection even more serious, due to the fact that PPR could also infect this species.

Conclusively, the results of our study dictate clearly that the control of commercial vaccines and vaccination strategy have to be evaluated by official Veterinary authorities immediately to combat the PPR infection, since it was first reported 15 years ago in Turkey, yet threatening severely the population of small ruminants concerned.

REFERENCES

- Albayrak H., Alkan F., 2009. PPR virus infection on sheep in blacksea region of Turkey: Epidemiology and diagnosis by RT-PCR and virus isolation. *Vet. Res. Commun.*, 33, 241-249.
- Anderson J., Mckay JA., Butcher RN., 1991. The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants viruses. In "The seromonitoring of rinderpest throughout Africa—Phase one", Ed., MH Jeggo, Proceedings of the final research coordination meeting of the FAO/IAEA/SIDA/OUA/IBAR/PARC coordinated research programme, Bingerville, Ivory-Coast, IAEA-TECDOC, 623, 43–53.
- Anonymous, 2009. Manual, chapter 2.7.11 in the manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Peste des petits ruminants. http://www.oie.int/eng/normes/MMANUAL/2008/pdf/2.07.11_PPR.pdf. [Acces:20.05.2010]
- Baron MD., Parida S., Oura CAL., 2011. Peste des petits ruminants: a suitable case for eradication? *Vet. Rec.*, 169, 16-21, doi: 10.1136/vr.d3947.
- Barrett T., Banyard AC., Diallo A., 2005. *Molecular Biology of the Morbilliviruses*. Virus plagues of large and small ruminants, Elsevier, Amsterdam.
- Chandran D., Bhaktavatsala RK., Vijayan SP., Sugumar P., Rani GS., Kumar PS., Rajendra LS., Srinivasan V., 2010. MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge. *Indian J. Microbiol.*, 50, 266-274.
- Diallo A., 1988. Rinderpest and peste des petits ruminants; constant threats to animal farming in many developing countries. *Impact Sci. Society*, 150, 179–192.
- Diallo A., Minet C., Goff CL., Berhe G., Albina E., Libeau G., Barrett, T., 2007. The threat of peste des petits ruminants: progress in vaccine development for disease control. *Vaccine*, 25, 5591-5597.
- Gür S., Albayrak H., 2010. Seroprevalance of peste des petits ruminants (PPR) in goitered gazelle

- (*Gazella subgutturosa subgutturosa*) in Turkey. *J. Wildlife Dis.*, 46, 673-677.
- Intizar M., Ahmad MD., Anjum AA., Hanif A., 2009. Comparative efficacy of peste des petits ruminants (PPR) vaccines available in Pakistan in sheep and goats. *Pak. Vet. J.*, 29, 202-205.
- Khan HA., Siddique M., Arshad MJ., Khan QM., Rehman SU., 2007. Sero-prevalence of peste des petits ruminants (PPR) virus in sheep and goats in Punjab province of Pakistan. *Pak. Vet. J.*, 27, 109-112.
- Kwiatak O., Minet C., Grillet C., Hurard C., Carlsson E., Karimov B., Albina E., Diallo A., Libeau G., 2007. Peste des petits ruminants (PPR) outbreak in Tajikistan, *J. Comp. Pathol.*, 136, 111-119.
- Mahapatra M., Parida S., Baron MD., Barrett T., 2006. Matrix protein and glycoproteins F and H of Peste-des-petits-ruminants virus function better as a homologous complex. *J. Gen. Virol.*, 87, 2021-2029.
- Ozmen O., Kale M., Haligur M., Yavru, S., 2009. Pathological, serological, and virological findings in sheep infected simultaneously with bluetongue, peste des petits ruminants, and sheeppox viruses. *Trop. Anim. Health Pro.*, 41, 951-958.
- Sarkar J., Sreenivasa BP., Singh RP., Dhar P., Bandyopadhyay SK., 2003. Comparative efficacy of various chemical stabilizers on the thermostability of a live-attenuated peste des petits ruminants (PPR). *Vaccine*, 21, 4728-4735.
- Siddique MP., Rahman MB., Chowdhury SMZH., Kafi MA., Alam MS., 2006. Determination of efficacy of thermostable ppr live homologous vaccine incubated at room temperature for 14 days. *Bangladesh J. Vet. Med.*, 4, 43-46.
- Singh RP., Sreenivasa BP., Dhar P., Shah LC., Bandyopadhyay, SK., 2004. Development of a monoclonal antibody based competitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus. *Vet. Microbiol.*, 98, 3-15.
- Worrwall EE., Litamoi JK., Seck B., Ayelet M., Xerovac G., 2001. An ultra rapid method for the dehydration and preservation of live attenuated rinderpest and peste des petits ruminants vaccines. *Vaccine*, 19, 834-839.



Yetişkin Sıçanlarda Testis Hücreleri ve Kalsinörin Immunopozitifliği Üzerine Ketaminin Etkileri: Bir Immunohistokimyasal ve Histopatolojik Çalışma

Yıldırım KALKAN^{1✉}, Levent TÜMKAYA¹, Habib BOSTAN², Yakup TOMAK²,
Durdu ALTUNER³, Orhan BAŞ⁴, Orhan Ünal ZORBA⁵, Hakkı UZUN⁵

1. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Rize.
2. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Rize.
3. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı, Rize.
4. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Rize.
5. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Rize.

Özet: Bu çalışmada, sıçanlara uygulanan uzun süreli ketaminin testis germ hücreleri ve kalsinörin immunopozitif hücreler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Otuz adet, yetişkin Sprague-Dawley erkek sıçan her grupta 6'şar adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. On dört gün süreyle ve günde iki defa olmak üzere, grup 1, 2, 3 ve 4'e sırasıyla 40, 60, 80 ve 100 mg/kg ketamin hidroklorid ve grup 5'e ise sadece % 0,9 NaCl intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. Bu çalışmada, ketamin uygulanan gruplarda testis bağ dokusunda ödem ve germ hücrelerinde dejenerasyonlar gözlemlendi. Grup 3 ve 4'te, tubulus seminiferus lumenlerinde sperm miktarındaki azalmanın grup 1 ve 2'ye göre daha fazla olduğu belirlendi. Uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının bir sonucu olarak, spermatogenetik germ hücreleri ve Leydig hücreleri miktarında da azalma olduğu tespit edildi. Ayrıca, immunohistokimyasal yöntemler ile boyanmış testis dokusu kesitlerinde, kalsinörin'in değişik derecelerde, (+)'dan (+++)'a kadar, immunoreaktivite verdiği gözlemlendi. Sonuç olarak, uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının testis intersitisyel dokularında, sperm yoğunluğunda ve germ hücre miktarlarında histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler yapabileceği belirlenmiş oldu. Ayrıca, uzun süreli ketamin infüzyonunun erkek infertilitesine neden olabileceği de düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: İmmunohistokimya, Kalsinörin, Ketamin, Sıçan, Testis.

Effects on Calcineurin Immunopositivity and Testes Cells of Ketamine in Adult Rat: An Immunohistochemistry and Histopathological Study

Abstract: In this study, we aimed to investigate the effects of long-term ketamine upon testis germ cells and the regional distributions of calcineurin immunopositive testis germ cells in adult male rats. Thirty adult male, Sprague-Dawley rats were divided into one control and four treatment groups, with 6 rats in each. Rats in treatment groups of 1, 2, 3 and 4 received ketamine at doses of 40, 60, 80 and 100 mg/kg intraperitoneal (i.p.), respectively, while those in group 5 (as control) received i.p. 0.9 % NaCl. In this study, we observed degeneration in germ cells and oedema in testis connective tissue. However, we determined that ketamine remained in tissue for a long term and high-dose resulted in a decrease in the numbers of germ cells and Leydig cells. However, there were varying degrees, from (+) to (+++), of calcineurin immunoreactivity in testicular tissue sections stained with immunohistochemical methods. The results suggest that long-term use of high-dose ketamine may cause male infertility due to histopathological and immunohistochemical changes in testicular interstitial tissues, as well as changes in sperm density and germ cell number.

Key words: Immunohistochemistry, Calcineurin, Ketamine, Rat, Testes.

GİRİŞ

Ketamin, tıbbi tedavide analjezik ve anesteziik etki amacıyla kullanılan bir ilaçtır (Reich, 1989). Aynı zamanda sempatomimetik etkisiyle katekolamin salınımını arttırdığı bilinmektedir. (White ve Ryan, 1996). Yüksek dozu insanlarda sayıklama, amnezi, yüksek tansiyon, şiddetli konfüzyon, aşırı korku, depresyona neden olurken düşük dozlarının kas titremeleri ve çift görmeye neden olduğu bildirilmiştir (Craven, 2007). Ketaminin uzun süreli yanık pansumanlarında, kronik ağrı tedavilerinde, alkol bağımlılığı tedavisinde ve ilaç dışı kötüye kullanım şeklinde uygulandığı ifade edilmiştir (Krupitsky ve ark., 1997; Goldberg ve ark., 2005; Krystal ve ark., 2006; Dahan ve ark., 2011; Sorensen ve ark., 2011). Ayrıca, ketaminin seksüel aktiviteyi artırıcı etkisine bağlı olarak eğlence mekânlarında kullanıldığı da bildirilmektedir (Smith ve ark., 2002).

Ketamin, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi aşamalarında kalsiyum mobilizasyonu ve mitokondriyal ATP sentezini azaltarak yapısal bozukluklar oluşturabilmektedir (Chen ve Chen 2010). Ketaminin ekstrasellüler kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğu ve bunun sonucunda, kalsinörin immuno-reaktivitesini azalttığı da tespit edilmiştir (Chen ve Chen 2010). Kalsinörin, kalsiyum tarafından aktive edilen bir efektör olup, mitoz ve mayoz bölünmede, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması ve apoptozis gibi hücrenel süreçlerde önemli bir mesajcı görevini üstlenmektedir. Bağışıklığı baskılayıcı maddeler için hedef molekül olan kalsinörin, T lenfositler başta olmak üzere birçok hücrenin sinyal transdüksiyonu, immun cevap genlerinin aktivasyonu (Loh ve ark., 1996a, 1996b; Shibasaki ve ark., 2002; Sugiura ve ark., 2002; Rusnak ve ark., 2000) ve fonksiyonlarının düzenlenmesi gibi biyolojik yaşam süreçlerinde önemli görevler yapmaktadır (Nishio ve ark., 2000; Yamashita ve ark., 2000). Vücutta bütün dokularda geniş bir dağılıma sahip olan kalsinörin (Miyamoto ve ark., 1994; Su ve ark., 1995; Sugiura, 2002), testislerde spermatogoniyalardan spermatosite kadar olan germ hücrelerinin olgunlaşma ve

farklılaşmalarını arttırdığı, başkalaşım geçiren spermatidlerde çekirdek kromatininin tekrar biçimlenmesinde rol oynadığı bildirilmektedir (Miyamoto ve ark., 1994; Su ve ark., 1995; Moriya ve ark., 1995).

Kalsinörin, memeli hücrelerinde kalsiyum düzenleyici birçok aşamada fosfataz fonksiyonlarını ortaya çıkartan önemli bir enzimdir. Semen içinde % 2-10 oranında bulunan spermin yaşayabilmesi için ortamda kalsiyum, çinko, laktöz ve albumin gibi birçok maddenin bulunması gereklidir. Kalsiyum, kalmodiline bağlanarak kalsinörini aktive eder ve intrasellüler kalsiyum seviyesinin artmasına neden olur (McKinsey ve ark., 2002). Sitoplazma içindeki iyonize kalsiyum konsantrasyonu ekstrasellüler sıvıdakinden 1000 kat daha azdır (Wacker ve ark., 1968). İntrasellüler kalsiyum seviyesinde artış sırasında ekstrasellüler kalsiyum seviyesinde düşüş meydana gelirken, kalsiyum tarafından aktive edilen kalsinörin azalma meydana gelir. Aktive olmuş kalsinörin NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) proteinlerinin defosforilasyonunu sağlayarak immun yanıt ve sitokin aktivasyonuna aracılık etmektedir. (Bushinsky ve ark., 1998; Guyton, 2001; Mulero ve ark., 2009). Ayrıca, kalsinörin GABA (Gamma-aminobutyric acid), NMDA (N-Methyl-D-aspartate) ve dopamin gibi birçok reseptöre de bağlanır (Bannai ve ark., 2009).

Daha önceden yapılan çalışmalarda, uzun süreli ketamin kullanımına bağlı olarak testislerde oluşabilecek histopatolojik ve immunohistokimyasal değişikliklerle ilgili yayınlara rastlanmamış olması bizim bu çalışmayı yapmamıza neden olmuştur. Bu araştırmada, sıçanlara uygulanan uzun süreli ve yüksek doz ketaminin testis germ hücreleri ve kalsinörin immunopozitif hücreler üzerine etkileri histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan deneyleri için kullanılan yöntemler "National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" protokolüne göre düzenlendi. Rize Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan gerekli izinler alındı (Tarih: 27.04.2010, Karar no: 14). Çalışmada 30 adet 250-300 gr. ve yaklaşık 250 günlük Sprague-Dawley erkek sıçan kullanıldı. Bütün hayvanlar 7-8 mm pelet sıçan yemi ve su ile ad libitum olarak beslendi. 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortam sağlamak için otomatik fotoperiyot ile beyaz floresan ışık kullanılıp, ortam ısıları $20 \pm 30^{\circ}\text{C}$ ve rutubet oranı % 55-60 olarak belirlendi. Hayvanlar her grupta altı adet olacak şekilde beş eşit gruba ayrıldı. On dört gün süreyle ve günde iki defa grup 1, 2, 3 ve 4'e sırasıyla 40, 60, 80 ve 100 mg/kg ketamin hidroklorid (Parke Davis & Co, UK) ve grup 5'e ise sadece 1 ml % 0,9 NaCl i.p. olarak uygulandı. Bu sürenin sonunda ketamin ile anestezi edilen deney hayvanlarının kuyruk venasından 2 ml kan heparinli tüplere alındıktan sonra hayvanlar servikal dislokasyonla sakrifiye edildi. Hayvanların kan-kalsiyum analizi otoanaliz cihazı ile yapıldı (Architect c16000 Autoanalyzer, Abbott Diagnostics, MA, USA). Histolojik incelemeler için hayvanların testis dokuları % 10'luk nötral formaldehit solüsyonuna alındı. Yirmi dört saat fiksatif içinde bekledikten sonra yaklaşık 6-8 saat arası akar suda yıkandı ve etanolksilen serilerinden geçilerek otomatik doku takibi (Citadel 2000, Thermo Fisher Scientific Shandon, England) yapılarak parafin içine gömüldü. Dokular rutin hematoksilin-eozin (H&E) ve immunohistokimyasal boyama için 4-5 μm kalınlığında kesildi.

Monoklonal antikor kullanarak hücre antijenlerini buldukları yerde göstermek için immunoperoksidaz boyamanın üretici tarafından tavsiye edilen prosedürü uygulandı. Alınan kesitler 20 dakika ksilen içerisinde bekletilip alkol serilerinden geçirildikten sonra distile suda yıkandı. 400 Watt güçte 30 dakika Sitrat buffer solüsyonu içinde ısıtıldı ve soğutuldu. Beş dakika distile suda ve 10 dakika PBS'de yıkandı-

tan sonra 10 dakika % 3 H_2O_2 solüsyonunda tutuldu ve PBS ile yıkandı. Sekonder bloklayıcı maddede 10 dakika bekletildi. Her bir preparat primer antikorun [Purified Mouse Anti-Calceinurin (29/Calceinurin,) BD Biosciences, USA] 1/200 dilüsyonunda 75 dakika bekletildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra biotin ile işaretlenmiş sekonder antikorda (Mini Flex Kit, DAKO, Denmark) 20 dakika bekletildi. PBS ile yıkandı, kromojen (3-3 Diaminobenzidin-DAKO) ile renklendirilerek Harris hematoksilin ile çekirdek boyaması yapıldı. Negatif kontroller için primer antikor yerine PBS kullanıldı. Preparatlar uygun kapatma maddesi (Entellan, Merck, Germany) ile kapatılarak fotoğrafları çekildi.

İmunohistokimyasal boyamalar sonucunda dokulardaki immunopozitif reaksiyonlar, hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olmak üzere 3 kategoriye ayrıldı. Spermatogenezisin gelişim aşamaları Johnsen'in Testiküler Biyopsi Skorumla yöntemi (Johnsen, 1970) ile değerlendirildi.

İstatiksel Analiz

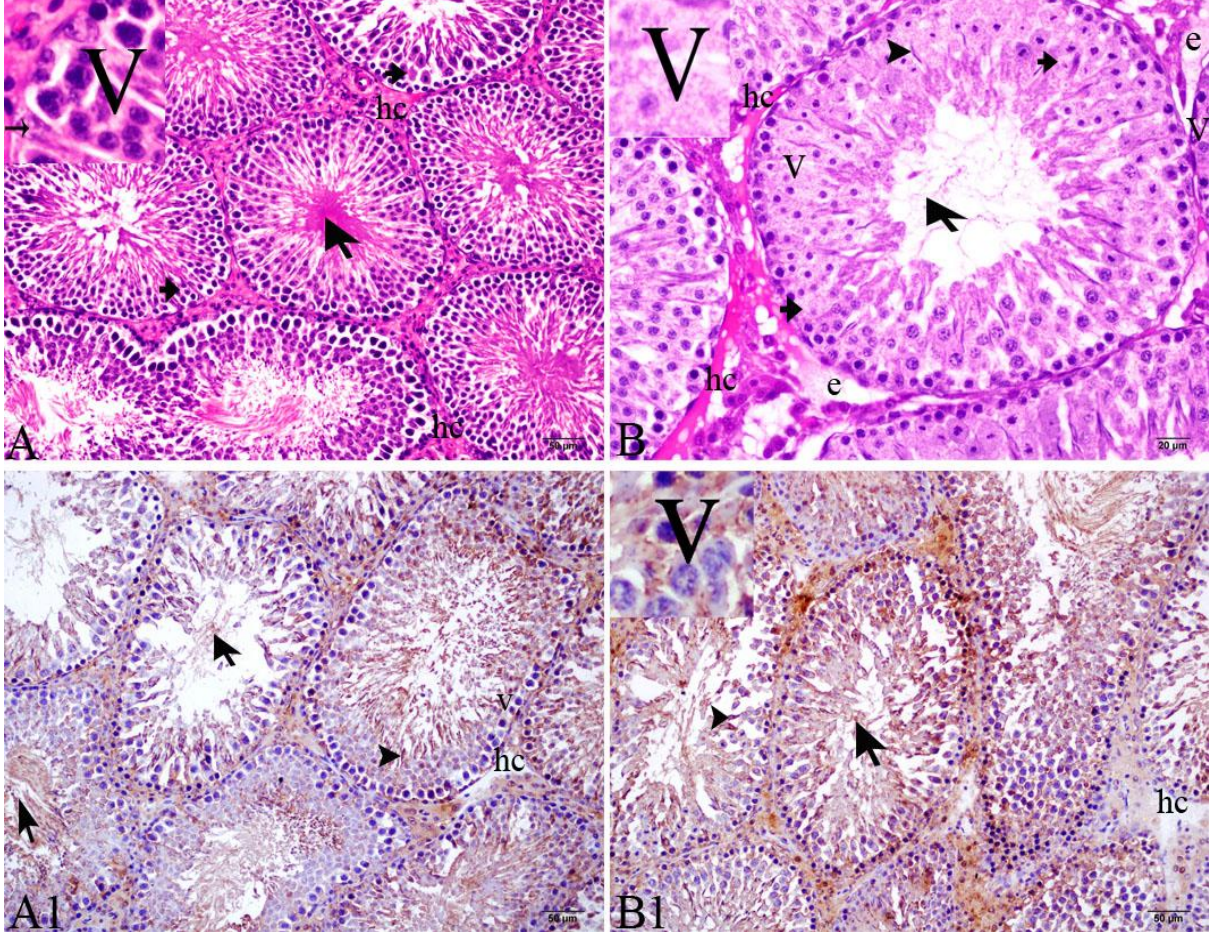
Her bir testisten rastgele elde edilen on adet preparat kalsinörünün immunoreaktivitesi yönünden incelendi. Her gruptan elde edilen preparatlardan toplam 120 alan (+), (++) , (+++) kategorilerine göre değerlendirildi. Sıçan testislerindeki hücrelerin kalsinörünün immunoreaktivitesini istatistiksel değerlendirme için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Gruplar arasındaki anlamlı farklılıkları belirlemek için ise Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U test yapıldı (SPSS 18 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA) (Tablo 1). Kalsiyum seviyelerinin gruplar arasındaki dağılımları istatistiksel yönden ANOVA ile incelendi ve çoklu karşılaştırmalar için LSD testi uygulandı (SPSS 18 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA) (Tablo 2).

SONUÇ

Çalışmamızda, deney gruplarına ait histolojik yarı kantitatif değerlendirmeler tablo 1 ve 2'de, kan-

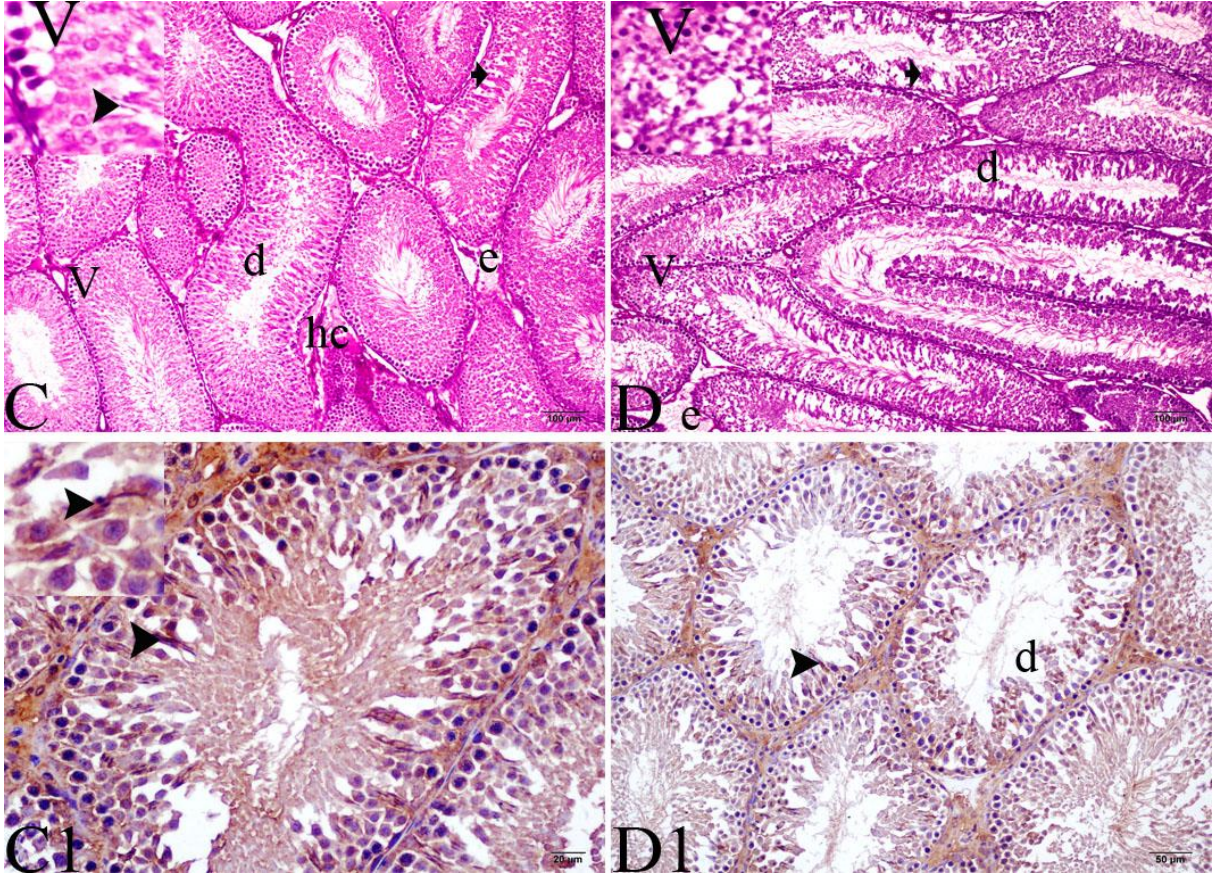
kalsiyum değerleri ise tablo 3’de gösterilmiştir. H&E ile boyanan kesitlerin histopatolojik incelenmesinde, grup 5 ile diğer gruplar karşılaştırıldığında; grup 1’de önemli bir patolojik bozukluk gözlenmezken, grup 2,

3 ve 4’de spermatogenik germ hücrelerinin dizilimlerinde bozukluk ve primer spermatositlerin morfolojilerinde değişiklikler gözlemlendi.



Şekil 1. Grup 1 ve 2’nin sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(A)** Grup 1- Ketamin 40 mg/kg; büyük ok: sperm, küçük ok: dejeneratif hücre, ince ok: sertoli hücresinde vakuolizasyon, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, H&E, X20, bar: 50 µm. **(B)** Grup 2-Ketamin 60 mg/kg; büyük ok: sperm, d: dejeneratif hücre, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, Siyah ok başı: sperm başı, e: ödem, H&E, X40, bar: 20 µm. **(A1)** Grup 1- Ketamin 40 mg/kg; büyük ok: sperm, v: vakuolizasyon, hc: hiyalinleşme, siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calcineurin / immunoperoksidaz boyama (IP), X20, bar: 50 µm. **(B1)** Grup 2- Ketamin 60 mg/kg; büyük ok: sperm, hc: hiyalinleşme, Ly: Leydig hücresi, siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calcineurin / immunoperoksidaz boyama, X20, bar: 50 µm.

Figure 1. The histopathological and immunohistochemical examination of rat testes of group 1 and 2; **(A)** Group 1- Ketamine 40 mg/kg; large arrow: spermium, small arrow: degenerative cells, thin arrow: vacuolization in sertoli, v: vacuolization, hc: hyaline cast, H&E, X20, bar: 50 µm. **(B)** Group 2- Ketamine 60 mg/kg; large arrow: spermium, d: degenerative cells, v: vacuolization, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, e: edema, H&E, X40, bar: 20 µm. **(A1)** Group 1- Ketamine 40 mg/kg; large arrow: spermium, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, v: vacuolization, Anti-Calcineurin / immunoperoxidase staining (IP), X20, bar: 50 µm. **(B1)** Group 2- Ketamine 60 mg/kg; large arrow: spermium, hc: hyaline cast, black arrowhead: part of the sperm head, v: vacuolization, Anti-Calcineurin / IP, X20, bar: 50 µm.

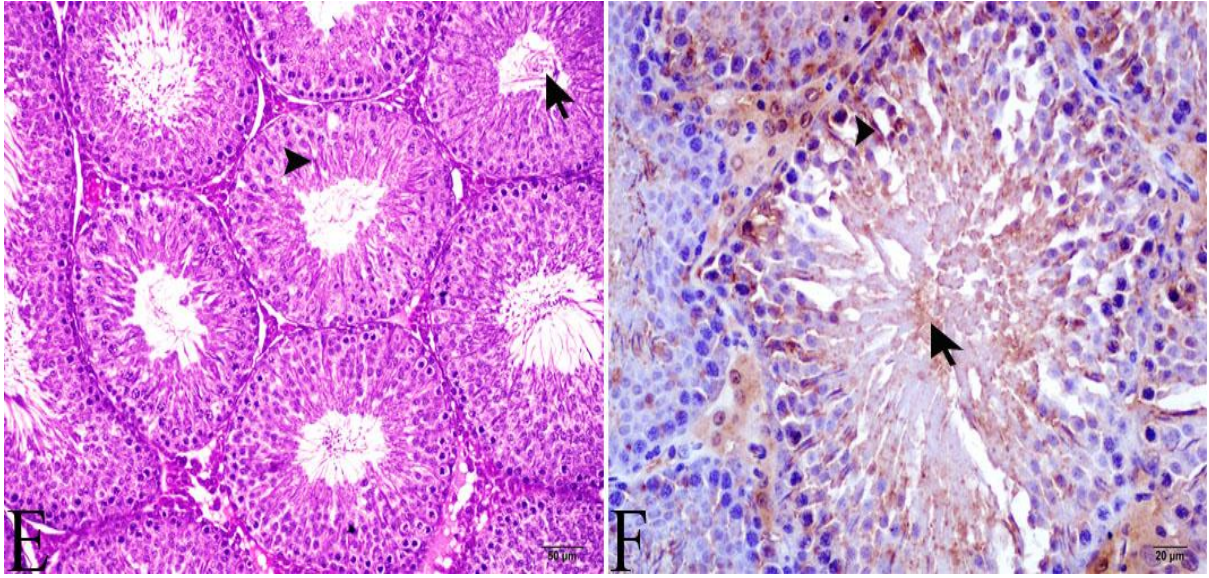


Şekil 2. Grup 3 ve 4'un sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(C)** Grup 3- Ketamin 80 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, küçük ok: dejeneratif hücre, e: ödem, v: vakuolizasyon, d: dejeneratif tubul, hc: hiyalinleşme, H&E, X10, bar: 100 µm. **(D)** Grup 4- Ketamin 100 mg/kg; küçük ok: dejeneratif hücre, e: ödem, v: vakuolizasyon, d: dejeneratif tubul, hc: hiyalin dökümü, H&E, X10, bar:100 µm. **(C1)** Grup 3- Ketamin 80 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, Anti-Calceineurin/ IP boyama, X40, bar:20 µm. **(D1)** Grup 4- Ketamin 100 mg/kg; siyah ok başı: sperm başı, d: dejeneratif tubul, Anti-Calceineurin/ IP boyama, X20, bar:50 µm.

Figure 2. The histopathological and immunohistochemical examination of rat testis of the group 3 and 4; **(C)** Group 3- Ketamine 80 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, small arrow: degenerative cell, e: edema, v: vacuolization, d: degenerative tubule, hc: hyaline cast, H&E, X10, bar: 100 µm. **(D)** Group 4- Ketamine 100 mg/kg; small arrow: degenerative cell, e: edema, v: vacuolization, d: degenerative tubule, hc: hyaline cast, H&E, X10, bar:100 µm. **(C1)** Group 3- Ketamine 80 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, Anti-Calceineurin/ IP stain, X40, bar:20 µm. **(D1)** Group 4- Ketamine 100 mg/kg; black arrowhead: part of the sperm head, d: degenerative tubule, Anti-Calceineurin/ IP stain, X20, bar:50 µm.

Primer spermatositlerin düzgün-yuvarlak ve mitotik şekilli çekirdek yapıları kaybolarak nekroz olduğu tespit edildi. Özellikle primer spermatositlerde gözlenen vakuolizasyonlar ve hücre dejenerasyonları grup 4'te grup 3'e göre daha belirgindi (Şekil 2A ve B). Grup 1 ve 2'de ise germ hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyonlar az gözlenirken (Şekil 1 A), grup 3 ve 4'te daha fazla hücre dejenerasyonları ve vakuolizasyonlar meydana geldiği görüldü. Bunlara ek olarak, interstisyel

bağ doku alanlarında ödem, hiyalinleşme ve vakuolizasyonlar tespit edildi. Grup 3 ve 4'e ait seminifer tubulus lümenlerinde sperm yoğunluklarında belirgin azalmalar olduğu gözlemlendi. Grup 4'te spermatogenetik germ hücre dizilimlerinde yoğun hücre kayıpları belirlendi. Birçok tubulusta erken ve geç spermatidlerin oluşum basamakları gözlenmezken, bazı lümenlerin merkeze yakın alanlarında az miktarda olgun sperm tespit edildi (Şekil 1, 2 ve 3).



Şekil 3. Kontrol grubu sıçan testislerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal incelenmesi; **(E)** Grup 5; büyük ok; sperm, siyah ok ucu: Sperm başı, H&E, X20, bar: 50 µm. **(F)** Grup 5; büyük ok; sperm, siyah ok ucu: Sperm başı, Anti-Calcineurin/ IP boyama, X40, bar: 20 µm

Figure 3. The histopathological and immunohistochemical examination of the control group rat testes; **(E)** Group 5; large arrow: spermium, black arrowhead: part of the sperm head, H&E, X40, bar: 20 µm **(F)** Group 5; large arrow: spermium, black arrowhead: part of the sperm head, Anti-Calcineurin/ IP stain, X40, bar: 20 µm

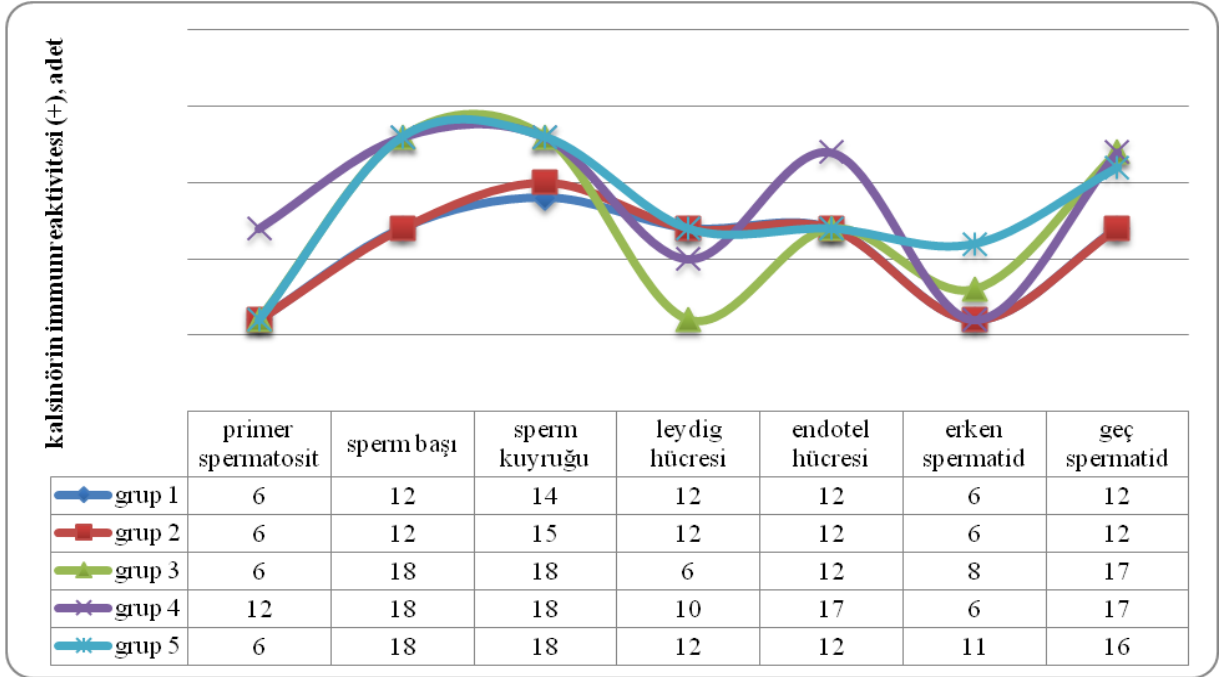
İmunohistokimyasal yöntemler ile boyanmış kesitlerde, kalsinörin immunopozitifliğinin testis dokularının farklı alanlarında (+)'dan (+++)'a kadar değişik derecelerde immunoreaktivite verdiği gözlemlendi. Buna göre; bütün gruplarda özellikle olgun spermilerin baş ve kuyruk ucuna yakın alanlarının (++) ve (+++) olarak daha koyu renkle boyandığı gözlemlendi (Şekil 1). Primer spermatositler ve erken spermatidlerin, geç spermatidlere göre daha az immunoreaktivite gösterdiği tespit edildi (Şekil 2).

Bazı Leydig hücreleri ve damar endotel hücreleri orta derecede pozitif (++) boyanmasına karşın (Şekil 1-B1), interstisyel alan içindeki hiyalin yapıları ile benzer immunoreaktivite gösterdi (Şekil 1-A1). Grup 3 ve 4'de lümene yakın alanlarda yerleşmiş olan geç dönem spermatidlerin, akrozomal kep aşamasındaki erken dönem spermatidlere göre daha koyu boyanıp şiddetli immunopozitiflik (+++) gösterdikleri belirlendi (Tablo1 ve Tablo 2), (Şekil 1, 2 ve 3).

Tablo 1. Testislerdeki kalsinörin immunoreaktivitesinin yarı kantitatif değerlendirilmesi.

Table 1. Semi-quantitative assessment of calcineurin immunoreactivity in the testes.

Gruplar	n	Primer spermatosit	Sperm başı	Sperm kuyruğu	Leydig hücresi	Endotel hücresi	Erken spermatid	Geç spermatid
Grup 1	6	+	++	++	++	++	+	++
Grup 2	6	+	++	++	++	++	+	++
Grup 3	6	+	+++	+++	+	++	+	+++
Grup 4	6	++	+++	+++	+	++	+	+++
Grup 5	6	+	+++	++	++	++	++	++

Tablo 2. Sıçan testis hücrelerinin kalsinörünün immunoreaktivitesinin sayısal skorlarının grafiksel gösterimi.**Table 2.** Graphical monitoring of the numerical scores of the calcineurin immunoreactivity of rat testis cells.**Tablo 3.** Deney gruplarındaki sıçanların kalsiyum seviyeleri değer aralığı ve ortalama standart sapma.**Table 3.** The Std. Error \pm Mean and value range of calcium levels in rats of experimental groups.

Gruplar	Kalsiyum değer aralığı	Ortalama \pm Standart Hata
Grup 1	5,6-6,8 mg/dL	5,93 \pm 0,19
Grup 2	5,9-6,9 mg/dL	6,27 \pm 0,159
Grup 3	7,0-8,3 mg/dL	7,42 \pm 0,193
Grup 4	7,8-8,9 mg/dL	8,20 \pm 0,18
Grup 5	5,3-6,5 mg/dL	5,88 \pm 0,19

Karşılaştırılan beş grubun primer spermatozoid, sperm başı, sperm kuyruğu, Leydig hücresi, endotel hücresi, erken spermatid ve geç spermatidlerde immunohistokimyasal boyama yönünden pozitif immunoreaktiviteleri istatistiksel olarak incelendi. Yapılan değerlendirmelerde, grup 4 ile grup 5'deki primer spermatozoidlerin ($p=0,002$) ve Leydig hücrelerinin ($p=0,002$) diğer gruplara göre immunoreaktivitelerinin anlamlı düzeyde farklı olduğu belirlendi. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunmadı ($p>0,05$).

Deney gruplarına ait kalsiyum değerleri karşılaştırılmasında kontrol grubuna göre uygulama gruplarının kan kalsiyum oranının daha fazla olduğu

belirlendi (Tablo 3). Grup 5 ile grup 1 ve 2 arasında istatistik yönden anlamlı farklılık bulunmazken ($p>0,05$), grup 5 ile grup 3 ve 4 arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu saptandı ($p<0,05$).

TARTIŞMA

Cerrahi işlemlerin sorunsuz yapılabilmesi için canlıların derin uyku halinde bulunması önemlidir. Ketamin, bu amaçla kullanılan disosiyatif ilaçlarının yanı sıra en sık kullanılan analjezik ve anesteziik etkili bir ilaç olarak bilinir (Reich ve Silvey, 1989). Anesteziik maddelerin uygulama şekli ve süresine göre dokularda bir takım değişiklikler şekillendirdiği

bildirilmektedir (Heys ve ark., 1989; Salo ve ark., 1992; Beal ve ark., 2000; Arras ve ark., 2001). Bu çalışmada da uzun süreli uygulanan ketaminin testis dokusu ve doku kalsinörünü üzerine etkileri immuno-histokimyasal ve histopatolojik yöntemlerle belirlenmiştir.

Ketaminin, dopamin aktivitesini artırarak seksual uyarılma ve istekte önemli bir rol oynadığı kabul edilmesine karşın (Melis ve Argiolas, 1994), çalışmamız ile ilacın uzun süreli kullanımının testis dokularında dejeneratif ve histopatolojik değişiklikler yaptığı belirlendi. Ketamin uygulamaları, hücrelerde çekirdek yoğunlaşması ve sitoplazmadaki organellerin bozulması ile karakterize apoptotik hücre ölümlerini arttırabilmektedir (Takadera ve ark., 2006). Grup 3 ve 4'te primer spermatositlerde meydana gelen morfolojik değişikliklerin hücresel dejenerasyonlara bağlı olduğu, karyolizis yapısında ve apoptotik eozinofilik hücre görünümüne sahip olduğu tespit edildi.

Mitoz ve mayoz bölünme, hücre farklılaşması, hücre yaşlanması ve apoptoziste önemli rol üstlenen kalsinörin (Nishio ve ark., 2000; Yamashita ve ark., 2000), vücudumuzun bütün dokularında değişik yoğunluklarda dağılmış ve aktif halde bulunan bir proteindir (Miyamoto ve ark., 1994). Kalsinörin, testislerdeki germ hücrelerinin farklılaşma aşamalarında önemli görevler yapar. Spermatogonyumlardan spermiyuma kadar geçen spermatotogenesis ve spermiyogenezis safhalarındaki germ hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşmalarını arttırdığı, başkalaşım geçiren spermatidlerde ise çekirdek kromatininin tekrar biçimlenmesi ve olgun spermiyuma dönüşmesinde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Tash ve ark., 1988; Su ve ark., 1995; Moriya ve ark., 1995).

Bu çalışmada, kontrol grubuna nazaran diğer gruplarda erken spermatidlerin immunopozitifliğinin düşük olması ile ketaminin kalsinörin immunoreaktivitesini olumsuz olarak etkilediği ve yüksek doz uygulanan grup 3 ve 4'ün tubulus lümenlerindeki sperm miktarında azalma meydana getirdiği

görüldü. Bütün grupların olgun spermiyumlarının baş ve kuyruk kısımlarında immunopozitivitenin (+)'dan yüksek olarak gözlenmesi, ketaminin spermiyogenezis aşamasındaki germ hücrelerinde önemli bir değişikliğe neden olmadığını gösterdi. Ayrıca, erken dönem spermatidlerinin gelişim süreçlerinde meydana gelen immunoreaktivitenin geç dönem spermatidlere göre azlığı ile yüksek doz ketaminin kalsinörin üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

Kalsinörin akrozomal kep safhasından itibaren testis germ hücrelerinin çekirdeği içinde birikmeye başladığı bildirilmiştir (Moriya ve ark., 1995). Çalışmamızda, erken dönem spermatidlerinin immunopozitifliğinin düşük olması kalsinörin birikiminin reaktivite verecek kadar sağlanmadığını gösterilmesi bakımından önemlidir.

Takrolimus gibi immun sistemi baskılayıcı etkisi olan ve kalsinörünü inhibe eden maddeler sertoli hücrelerinin miktarında azalma ve spermatogenik germ hücrelerinde dejenerasyonlar yaparak seminifer tubuluslarda önemli histopatolojik hasarlar meydana getirdiği ifade edilmiştir (Canequim ve ark., 2009). Sertoli hücreleri tarafından immun sistemi baskılayıcı moleküllerin üretildiği bildirilmiştir (De Cesaris ve ark., 1992). Yapılan çalışmalarda takrolimus gibi ketamininde immun sistemi baskılayıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Wilson ve ark. 1971). Çalışmamızda, sertoli hücrelerinin morfolojilerinde bozukluklar olduğu, apikal sitoplazmalarının lümenine kadar ulaşmadığı gözlemlendi. Yüksek doz ketaminin uzun süreli kullanımından kaynaklanan kalsinörin miktarındaki azalmanın sertoli hücrelerindeki değişikliklerin nedeni olabileceği kanaatine varıldı.

Ketaminin ekstrasellüler kalsiyum seviyelerinde artışa neden olduğu bildirilirken (Chen ve Chen 2010) intrasellüler kalsiyum seviyesinde azalmanın ise hücre ölüm miktarını arttırdığı kabul edilmektedir (Farber ve ark., 1981). İntrasellüler kalsiyum homeostazisi hücrenin normal fonksiyonunun oluşturulması sürecinde çok önemlidir. Kalsiyum

iyonlarında artma ve azalma apoptozisin mümkün olan sebeplerindedir (McConkey ve ark., 1997; Berridge ve ark., 1998; Li ve ark., 2000). Çalışmamızda, kan kalsiyum seviyesindeki azalmanın kalsinörin immunoreaktivitesini azalttığı tesbit edildi.

Ketamin, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesi aşamasında kalsiyum mobilizasyonu ve mitokondriyal ATP sentezini azaltarak yapısal bozukluklar oluşturduğu bildirilmektedir (Chen ve Chen 2010). Bu çalışmamızda, kalsiyum seviyelerinde meydana gelen artışın uzun süreli kullanım ve doza bağlı olduğu, hücresel immunoreaktiviteyi etkilediği ve germ hücre yapılarının gelişim serilerinde dejenerasyonlar ile sitoplazmik vakuolizasyonlar meydana getirdiği gözlemlendi.

Çalışmamızdaki kan kalsiyumun değer aralığının (5,3-8,9 mg/dL) klinik yönden tolerans değerlerinin çok üstünde veya çok altında olmaması (5,3-13 mg/dL) kalsiyumda meydana gelen çok az değişikliğin bile immunoreaktiviteyi etkileyebileceğini gösterdi.

Sonuç olarak, uzun süreli ve yüksek doz ketamin kullanımının testis intersitisyel dokularında, sperm yoğunluğunda ve germ hücre miktarlarında azalma, tubul yapılarında dejenerasyon, sertoli ve germ hücrelerinde vakuolizasyon, intersitisyel alan içinde hiyalinizasyon gibi histopatolojik ve immunohistokimyasal değişiklikler yapabildiği, ilacın uzun süreli ve kronik infüzyon kullanımının erkeklerde fertilitate bozukluklarına sebep olabileceği kanaatine varıldı.

KAYNAKLAR

- Arras M., Autenried P., Rettich A., Spaeni D., Rüllicke T., 2001. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp. Med.*, 51, 443-56.
- Bannai H., Levi S., Schweizer C., Inoue T., Launey T., Racine V., Sibarita JB, Mikoshiba K., Triller A., 2009. Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron*, 62, 670-682.
- Beal MW., Brown DC., Shofer FS., 2000. The effects of perioperative hypothermia and the duration of anesthesia on postoperative wound infection rate in clean wounds: a retrospective study. *Vet. Surg.*, 29, 123-127.
- Berridge MJ., Bootman MD., Lipp P., 1998. Calcium--a life and death signal. *Nature*. 395, 645-648.
- Caneguim BH., Cerri PS., Spolidório LC., Miraglia SM., Sasso-Cerri E., 2009. Structural alterations in the seminiferous tubules of rats treated with immunosuppressor tacrolimus. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 25, 7-19.
- Chen JT., Chen RM., 2010. Mechanisms of ketamine-involved regulation of cytochrome P450 gene expression. *Expert. Opin. Drug Metab. Toxicol.*, 6, 273-281.
- Craven R., 2007. Ketamine. *Anaesthesia*, 62, 48-53.
- Dahan A., Olofsen E., Sigtermans M., Noppers I., Niesters M., Aarts L., Bauer M., Sarton E., 2011. Population pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of ketamine-induced pain relief of chronic pain. *Eur. J. Pain.*, 15, 258-267.
- De Cesaris P, Filippini A, Cervelli C, Riccioli A, Muci S, Starace G, Stefanini M, Ziparo E., 1992. Immunosuppressive molecules produced by Sertoli cells cultured in vitro: biological effects on lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 1639-1646.
- Farber JL., 1981. The role of calcium in cell death. *Life Sci.*, 29, 1289-1295.
- Goldberg ME., Domskey R., Scaringe D., Hirsh R., Dotson J., Sharaf I., Torjman MC., Schwartzman RJ., 2005. Multi-day low dose ketamine infusion for the treatment of complex regional pain syndrome. *Pain Physician*, 8, 175-179.
- Heys SD., Norton AC., Dundas CR., Eremin O., Ferguson K., Garlick PJ., 1989. Anaesthetic agents and their effect on tissue protein synthesis in the rat. *Clin. Sci. (Lond.)*, 77, 651-655.
- Huang R-Q., and Dillon GH., 1998. Maintenance of recombinant type A g-aminobutyric acid receptor function: role of protein tyrosine phosphorylation and calcineurin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 286, 243-255,

- Johnsen SG., 1970. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1, 2-25.
- Johnson-Delaney C., 1996. *Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians*, Lake Worth, FL: Zoological Education Network.
- Krupitsky EM., Grinenko AY., 1997. Ketamine psychedelic therapy (KPT): a review of the results of ten years of research. *J. Psychoactive Drugs*, 29, 165-183.
- Krystal JH., Madonick S., Perry E., Gueorguieva R., Brush L., Wray Y., Belger A., D'Souza DC., 2006. Potentiation of low dose ketamine effects by naltrexone: potential implications for the pharmacotherapy of alcoholism. *Neuropsychopharmacology*, 31, 1793-1800.
- Li M., Kondo T., Zhao QL., Li FJ., Tanabe K., Arai Y., Zhou ZC., Kasuya M., 2000. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *J. Biol. Chem.*, 275, 39702-39709.
- Loh C., Carew JA., Kim J., Hogan PG., Rao A., 1996. T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol. Cell Biol.*, 16, 3945-3954.
- Loh C., Shaw KT., Carew J., Viola JP., Luo C., Perrino BA., Rao A., 1996. Calcineurin binds the transcription factor NFAT1 and reversibly regulates its activity. *J. Biol. Chem.*, 271, 10884-10891.
- McConkey DJ., Orrenius S., 1997. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239, 357-366.
- McKinsey TA., Zhang CL., Olson EN., 2002. MEF2: a calcium-dependent regulator of cell division, differentiation and death. *Trends Biochem. Sci.*, 27, 40-7.
- Melis MR., Argiolas A., 1995. Dopamine and sexual behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* Spring, 19, 19-38.
- Miyamoto K., Matsui H., Tomizawa K., Kuwata Y., Itano T., Tokuda M., and Hatase O., 1994. In situ localization of rat testis-specific calcineurin B subunit isoform b1 in the developing rat testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 203, 1275-1283.
- Moia LJ., Matsui H., de Barros GA., Tomizawa K., Miyamoto K., Kuwata Y., Tokuda M., Itano T., Hatase O., 1994. Immunosuppressants and calcineurin inhibitors, cyclosporin A and FK506, reversibly inhibit epileptogenesis in amygdaloid kindled rat. *Brain Res.*, 648, 337-341.
- Moriya M., Fujinaga K., Yazawa M., and Katagiri C., 1995. Immunohistochemical localization of the calcium/calmodulin-dependent protein phosphatase calcineurin, in the mouse testis: its unique accumulation in spermatid nuclei. *Cell Tissue Res.*, 281, 273-281.
- Mulero MC., Aubareda A., Orzaez M., Messeguer J., Serrano-Candelas E., Martinez-Hoyer S., Messeguer A., Perez-Payá E., Pérez-Riba M., 2009. Inhibiting the calcineurin-NFAT (nuclear factor of activated T cells) signaling pathway with a regulator of calcineurin-derived peptide without affecting general calcineurin phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 284, 9394-9401.
- Nishio H., Matsui K., Tsuji H., Tamura A., Suzuki K., 2000. Immunolocalization of calcineurin and FKBP12, the FK506-binding protein, in Hassall's corpuscles of human thymus and epidermis. *Histochem. Cell Biol.*, 114, 9-14.
- Reich DL., Silvay G., 1989. Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience. *Can. J. Anaesth.*, 36, 186-197.
- Ritta MN., Calamera JC., Bas DE., 1998. Occurrence of GABA and GABA receptors in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*, 4, 769-773.
- Rusnak F., Mertz P., 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.*, 80, 1483-1521.
- Salo M., 1992. Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 36, 201-220.
- Shibasaki F., Hallin U., Uchino H., 2002. Calcineurin as a multifunctional regulator. *J. Biochem.*, 131, 1-15.
- Smith KM., Larive LL., Romanelli F., 2002. Club drugs: methylenedioxymethamphetamine, flunitrazepam, ketamine hydrochloride, and gammahydroxybutyrate. *Am. J. Health Syst. Pharm.*, 59, 1067-1076.

- Sorensen AG., Barnung S., Rasmussen LS., 2011. Ketamine is used and abused in new ways. *Ugeskr Laeger*. 173, 2123-2126.
- Su Q., Zhao M., Weber E., Eugster HP., Ryffel B., 1995. Distribution and activity of calcineurin in rat tissues, Evidence for post-transcriptional regulation of testis-specific calcineurin. *B. Eur. J. Biochem.*, 230, 469-474.
- Sugiura R., Sio SO., Shuntoh H., Kuno T., 2002. Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells.*, 7, 619-627.
- Sugiura R., 2002. Functional analysis of calcineurin-mediated signalling pathway using fission yeast as a model system. *Nihon Yakurigaku Zasshi.*, 119, 155-161.
- Takadera T., Ishida A., Ohyashiki T., 2006. Ketamine-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 210, 100-107.
- Tash JS., Krinks M., Patel J., Means RL., Klee CB., and Means AR., 1988. Identification, characterization, and functional correlation of calmodulin-dependent protein phosphatase in sperm. *J. Cell Biol.*, 106, 1625-1633.
- White JM., Ryan CF., 1996. Pharmacological properties of ketamine. *Drug Alc. Review*, 15, 145-155.
- Wilson RD., Priano LL., Traber D., et al., 1971. An investigation of possible immunosuppression from ketamine and 100% oxygen in normal human children. *Anesth & Analg.*, 50, 464-470.
- Yamashita M., Katsumata M., Iwashima M., Kimura M., Shimizu C., Kamata T., Shin T., Seki N., Suzuki S., Taniguchi M., Nakayama T., 2000. T cell receptor-induced calcineurin activation regulates T helper type 2 cell development by modifying the interleukin 4 receptor signaling complex. *J. Exp. Med.*, 191, 1869-1879.



Ülkemizdeki Deniz Memelileri Gösteri Merkezlerinin Durumu

Mehmet AYDIN✉, Uğur Yücel KESİCİ

Ordu Üniversitesi, Fatsa Deniz Bilimleri Fakültesi, Balıkçılık Teknolojisi Mühendisliği Anabilim Dalı, Ordu.

Özet: Bu çalışmada ülkemizdeki deniz memelileri gösteri ve terapi merkezlerinin durum tespiti ve bu merkezlerdeki memelilerin yaşam şartlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla 2007 yılı itibarıyla gösteri ve terapi merkezlerinin bulunduğu Aydın-Kuşadası, Muğla- Bodrum ve Marmaris, Antalya, Kaş, Kemer-Beldibi, Serik'teki merkezler incelenmiştir. Deniz memelilerinin yaş, boy, ağırlık, cinsiyet, beslenme, yaşam ortamları, sağlık koşulları gibi parametreleri belirlenmiştir. Tesislerde gösteri amaçlı ithal edilmiş toplam 12 adet yunus, 6 adet fok, 3 adet beyaz balina, 1 adet deniz aslanı ve 1 adet mors olduğu belirlenmiştir. Tespit edilen 35 adet yunustan 25 adetinin özellikleri incelenmiş, % 28'i dişi % 72'si erkek bireylerden, ortalama yaşlarının 12.26 ve ortalama ağırlıklarının da 170 kg olduğu hesaplanmıştır. Günlük yem tüketimlerinin yunuslar ve foklarda yaz aylarında 8 kg, kış aylarında 12 kg, deniz aslanının ve morsun ise 20 kg olduğu belirlenmiştir. Tesislerde çalışan personelin neredeyse tamamı yabancı uyruklulardan oluşmaktadır. Bunlardan çoğu (% 85) Rusya ve Ukrayna kökenli olduğu belirlenmiştir. Araştırma boyunca incelenen tesislerden sadece Marmaris'teki tesisin tamamen zihinsel ve bedensel engelliler terapisini sağlamak üzere kurulduğu tespit edilmiştir. Diğer tesislerin ise genel olarak şov amaçlı fakat ilave olarak zihinsel ve bedensel engellilere hizmet verme amacıyla kurulmuş olduğu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Deniz memelileri, Gösteri merkezleri, Terapi merkezleri.

Present Condition of Marine Mammals Show Centers of Turkey

Abstract: The aim of this study was to determine the present condition of marine mammals' parks and therapy centers in Turkey and their living conditions in these centers. For this purpose, in 2007, a survey program was carried out in Aydın-Kuşadası, Muğla-Bodrum and Marmaris, Antalya- Kaş- Kemer-Beldibi and Serik where centers are located. Age, length, weight, sex, diet, habitats and health condition parameters of the mammals were determined. It was seen that 12 dolphins, 6 seals, 3 white whales, a California Sea Lion and 1 walrus had been imported for the Centers. Twenty five out of 35 dolphin individuals were examined and it was determined that females and males comprised of 28 and 72 % respectively. The mean age was 12.26 years and mean weight 170 kg. Dolphins and seals 8 kg of food consumed per day at summers, 12 kg winters. This value was determined to be 20 kg for California Sea Lion and walrus. Consists almost exclusively of foreign staff working at these facilities and most of them (85 %), Russia and Ukraine are determined. Marmaris facility completely mental and physical disabilities have been identified for therapy services provided. Other facilities mainly were established for show purposes, in addition to established for therapy.

Key words: Marine mammals, Show centers, Therapy centers.

GİRİŞ

Avrupa Yaban Hayatı ve Yaşama Ortamlarını Koruma Sözleşmesi'nde yunuslar kesin koruma altına alınmış türler içerisinde yer almaktadır (Anonim, 1979). Bu sözleşmeye ülkemiz 1984 yılında taraf olmuş ve 1380 sayılı Su Ürünleri Kanunu ve burada bahsedilen Türkiye'nin taraf olduğu uluslar arası anlaşmalar gereği bu yıldan sonra da ülkemiz karasularında koruma altına alınmış ve hiçbir şekilde yakalanmalarına, öldürülmesine izin verilmemiştir.

Yunusların eğitilerek zihinsel ve bedensel engellilerin terapisi ile gösteri amaçlarıyla kullanıldığı ve olumlu sonuçlar alındığı söylenmektedir. Bu doğrultuda ülkemizdeki deniz memelileri gösteri yerlerindeki bu canlılar Nesli Tehlike Altında Olan Yabani Bitki ve Hayvan Türlerinin Uluslararası Ticaretine İlişkin Sözleşme kurallarına uygun olarak gerekli izin alınarak ithal edilmektedir (Anonim, 1973).

Ülkemizde 2006 yılında, ithalatta uygulanan prosedürün zorluğu ve taşıma esnasında yunusların zarar gördüğü gerekçesiyle, kurulan veya kurulacak olan merkezlerin ihtiyacı olan yunusların avcılığına sınırlı sayıda izin verilmesi talep edilmiş ve Tarım ve Köyişleri Bakanlığı da Bern Sözleşmesi'nin 9'uncu maddesinin "popülasyonun devamlılığına zarar vermeyecek hallerde sözleşme kapsamına giren bitki ve hayvan türlerinin az miktarda alımı, saklanması veya diğer akılcı kullanımlarına, çok sıkı gözetim altında, selektif ve sınırlı olmak kaydı ile izin verilmesi yönünden istisnalar getirebilir" hükmü gereğince bir sefere mahsus olarak 30 yunusun avcılığına izin vermiştir.

Bu kapsamda; yakalamanın, Tarım ve Köyişleri Bakanlığının belirlediği elemanlarının denetiminde yapılması ve yakalamanın gırgır ağlarıyla gerçekleştirilmesi uygun görülmüştür. Ayrıca yakalanan yunusların kayıt altına alınarak bunlar için menşei belgesi düzenlenmesi ve nakillerinin menşei belgesi eşliğinde gerçekleştirilmesi de gerekmektedir. Bunların yanı sıra yunusların konulacağı tesislerin

hayvan refahına uygun şartlarda olması, gerekli su kalitesinin sağlanması, düzenli olarak veteriner kontrollerinin yapılması, doğal şartlara uygun beslenme imkanlarının sağlanması, eğitimler ve terapiler esnasında zor kullanılmaması, şartları doğrultusunda, Nisan 2007 tarihine kadar toplam 23 adet yunus yakalanarak, gösteri ve terapi amacıyla kurulan tesislere konulmuştur. Bu tarihten sonra ise hiçbir şekilde yunus yakalanmasına izin verilmemiştir. Yunusların konulduğu gösteri ve terapi merkezleri Tarım ve Köyişleri Bakanlığı İl Müdürlükleri kanalıyla periyodik olarak ayda bir denetlenmekte ve durumları kayıt altına alınmaktadır (Aydın ve ark., 2008).

Yunusların terapi amaçlı kullanımı, 1970'li yıllarda resmi olarak başlamış ve ABD, Meksika, İsrail, Rusya, Japonya, Çin ve Bahama gibi birçok ülkede oldukça kazandıran bir iş kolu haline gelmiştir. Fakat, bu terapi merkezleriyle ilgili olumlu ve olumsuz bir çok şey söylenmektedir. Yunuslar ve insanlar arasındaki fiziksel kontakın fizyolojik ve psikolojik açılarından olumlu etkileri araştırıldığında normal çocuklardan farklı eğitime ihtiyacı olan engelli çocuklarla ilgili çeşitli alanlarda başarılı sonuçların alındığı bilinmektedir. Bu konuyla ilgili yaklaşık 30 yıldır çalışmalar yapılmaktadır. İlk olarak otistik çocukların çevreleriyle iletişim kurmalarında yunusların kullanılmasını Smith, (1981) gerçekleştirmiştir. Daha sonra ki yapılan çalışmalarda ise bu çocukların eğitimi sırasında yunusların kullanılması, çocuklarda 2 ile 10 kat arasında daha hızlı gelişim sağladığı tespit edilmiştir (Nathanson, 1989). Yine yunuslarla etkileşim halinde olmalarında bu zihinsel engelli çocukların hiyerarşik bilişsel tepkilerinde önemli ilerlemelerin olduğu belirlenmiştir (Nathanson ve Faria, 1993). Ayrıca böyle bir etkileşimdeki çocukların aileleri ile sosyal ilişkilerinin de geliştiği gözlemlenmiştir (Voorhees, 1995). Yunuslarla oyun terapisi yönteminde, çevresindeki dünya ile iletişim kuramayan çocukların yunuslarla kolayca iletişim kurdukları gözlemlenmiştir. Bu özellik

onların eğitiminde kullanılmaktadır (Cole, 1996; Birch 1997). ABD’ de bu konuda çalışmalar yapan eğitim psikolojisi profesörü Nathanson, yunuslar ile yüzmenin otistik özellikleri olan çocuklarda endorfin salgısını etkilediğini, bağışıklık sistemini uyararak T hücrelerinin (vücudumuzun savunma hücreleri) üretimini hızlandırdığını belirtmektedir. Nathanson insanlardaki fiziksel kısıtlamaların ve engellerin yunusların doğal sonar sistemi ile algılandığını, özellikle şişe burunlu yunusların otistik özellikleri olan çocuklarla birlikte terapide kullanılması ile olumlu sonuçlar alındığını belirtmektedir (Nathanson ve ark., 1997; Lukina, 1999). Yunuslar ile yüzme tek başına otistik özellikleri olan çocukların iletişim kurmalarını kolaylaştırdığı gibi, normal bir eğitim sistemine paralel olarak motivasyon amaçlı da kullanılabilir. Bireysel eğitim alan çocuk bu eğitimde kazandığı başarılar için yunusla yüzme ile motive edilmektedir (Lukina, 1999; Lysenko ve ark., 2000; Heimlich 2001). Yaklaşık 1500 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada engelli çocukların duygusal statülerinde olumlu etkilerin olduğu belirlenmiştir (Lukina, 1999).

Hekimlerin ve bir yunus antrenörünün kontrolü altında bu hayvanlar hastalarla temas ve iletişim kurmayı içgüdüsel olarak bilmektedirler. Bu temas esnasında hiçbir ilacın veya hekimin mobilize edemeyeceği güç ve tesirde olanaklar ortaya çıkmaktadır. Bu deniz memelileri muhtemelen ultrason vasıtasıyla hastayı yoklarken hasta organlara mahsus karakteristik vibrasyonu hissetmektedirler (Birch, 1998). Yapılan araştırmalar sonucu, ultrason ışınlanması esnasında omurga ve beynin rezonans titreşimine girdiği ve bunun da sinir sistemin daha iyi çalışmasını sağlayan çeşitli biyokimyasal maddelerin üretimini stimüle ettiği anlaşılmıştır. Yunusla kurulan doğrudan temas esnasında bu nedenle insanda korku, stres ve gerginlik hisleri azalmakta, kişi pozitif enerjilerin akmaya başladığını hissetmekte ve negatif duygulardan arınmaktadır (Birch, 1995; Birch 1998).

Yunusla yapılan terapilerin engellilerin tedavisinde oldukça etkili bir yöntem olduğu iddia edilmesine rağmen, uzun vadede katkılarının bilimsel olarak yeterli dayanağının olmadığı da belirtilmektedir. Balina ve Yunus Koruma Derneği (*The Whale and Dolphin Conservation Society-WDCS*) yunus terapi merkezlerinde insanların kandırıldığı, duygularının istismar edildiği, olağanüstü tanıtıma rağmen bu yöntemin hiçbir bilimsel dayanağının olmadığını belirtmektedirler (Brakes ve Williamson, 2007).

Yine ABD’de yapılan bir çalışmada WDCS'nin endişeleri doğrulanmaktadır. Araştırmacılar, bu konuyla ilgili son sekiz yıl içinde yayınlanmış olan beş hakemli çalışmayı incelenmiş ve beş çalışmanın da metodolojik olarak kusurlu olduğu, yunus terapisinin geçerli bir tedavi olduğunu veya ruh halindeki kısa süreli iyileşmelerden daha fazlasını yapabildiğini gösteren hiçbir kanıt olmadığını belirtmiştir (Marino ve Lilienfeld, 2007).

Yapılan bu çalışmayla gösteri ve terapi amaçlı kullanılan deniz memelileri merkezlerinin fiziksel yapıları ve canlıların bazı biyolojik özellikleri ortaya konmaya çalışılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma 2007 yılında gösteri ve terapi merkezlerinin bulunduğu Aydın-Kuşadası, Muğla (Bodrum ve Marmaris), Antalya (Kaş, Kemer, Beldibi ve Serik) ’daki işletmeler ziyaret edilerek yüz yüze görüşmeler ve anketler yapılmış, deniz memelileri (afalina türü yunus “*Tursiops truncatus*”, fok “*Callorhinus ursinus*”, beyaz balina “*Delphinapterus leucas*” mors “*Odobenus rosmarus*” ve deniz aslanı “*Zalophus californianus*”) tesislerinin durumları ortaya konmaya çalışılmıştır. Tespit edilen deniz memelilerinin bazı biyolojik ve morfometrik parametreleri (yaş, boy, ağırlık, cinsiyet, beslenme, yaşam ortamları, sağlık koşulları vb.) belirlenmiştir.

SONUÇ

Ülkemizde 8 tesis belirlenmiş ve tamamı incelenmiştir. Tesislerde terapi ve gösteri amacıyla bulunan deniz memelilerinin dağılımları Tablo 1'de belirtilmektedir.

Yapılan çalışmada her canlının tesisdeki sorumlu eğitimleriyle birebir görüşme yapılarak ve canlılar hakkında tutulan kayıt defterleri incelenerek elde edilen veriler Tablo 2'de verilmiştir.

Tesislerde ithal edilmiş toplam 6 adet *Callorhinus ursinus* türü fok tespit edilmiş ama bunlarla ilgili kayıtlara ulaşılamamıştır. Tespit edilen 3 beyaz balinanın 2'sinin erkek, olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 1 dişi deniz aslanı ve 1 de dişi mors tespit edilmiştir.

Gösteri ve terapi amaçlı tesislerde bulunduran yunusların tespit edilen veriler dahilinde % 28'i dişi, % 72'si erkek bireylerden, en küçük yaştaki bireyin 4, en büyük bireyin 24, ortalamasının 12.26 ve en düşük ağırlığın 120 kg en büyük ağırlığın 250 kg, ağırlık ortalamasının da 170 kg olduğu hesaplanmıştır.

Tesislerdeki deniz memelilerinin bakımı ve eğitimi için biyologlar ve veterinerler görev yapmakta, her deniz memelisinin bir eğitmeni, bir veya iki eğitmen yardımcısı bulunmaktadır. Her iki deniz memelisiyle bir veteriner ilgilenmektedir. Çalışan personelin neredeyse tamamı yabancı uyruklu olup % 85'i Rusya ve Ukrayna kökenlidir. Ayrıca hastaların tedavisinde görevli olan terapistler bulunmaktadır.

Tablo 1. Deniz memelilerinin tesislere göre dağılımı

Table 1. Distribution of marine mammals according to facilities

İL	İLÇE	YAKALANAN YUNUS	İTHAL EDİLEN				
			YUNUS	FOK	MORS	DENİZ ASLANI	BEYAZ BALİNA
AYDIN	Kuşadası	9	3	4	-	-	-
MUĞLA	Bodrum	4	-	-	-	-	-
MUĞLA	Marmaris	5	-	-	-	-	-
ANTALYA	Merkez	-	3	2	-	-	1
ANTALYA	Kaş	2	-	-	-	-	-
ANTALYA	Kemer	-	2	-	-	1	-
ANTALYA	Serik	3	2	-	1	-	2
ANTALYA	Beldibi	-	2	-	-	-	-
TOPLAM		23	12	6	1	1	3

Tablo 2. Tesislerdeki deniz memelilerin bazı biyolojik verileri

Table 2. Some biological parameters of marine mammals at the facilities

<i>Tursiops truncatus</i> (Yunus)			
Yaş	Boy(m)	Ağırlık(kg)	Cinsiyet
6	2.25	120	Dişi
4	2.20	120	Erkek
20	2.80	170	Erkek
12	2.50	150	Erkek
10	2.50	150	Erkek
6	2.30	140	Erkek
6	2.50	150	Dişi
14	3.00	180	Erkek
20	3.00	170	Dişi
16	2.55	---	Erkek
14	2.50	---	Erkek
20	2.70	---	Erkek
12	2.40	---	Erkek
15	2.35	---	Dişi
14	2.30	---	Dişi
9	2.20	---	Erkek
9.5	2.20	---	Erkek
24	2.40	---	Dişi
16	2.50	---	Dişi
14	2.45	---	Erkek
7	2.50	---	Erkek
7	2.50	---	Erkek
15	2.70	250	Erkek
8	2.60	220	Erkek
8	2.60	220	Erkek
<i>Delphinapterus leucas</i> (Beyaz balina)			
8	3.30	---	Erkek
8	3.25	---	Erkek
---	---	---	Dişi
<i>Odobenus rosmarus</i> (Mors)			
4	---	---	Dişi
<i>Zalophus californianus</i> (Deniz Aslanı)			
16	---	475	Dişi

Doğadan yakalanan yunusların adaptasyonlarında sıkıntı yaşanmadığı, ilk 2 gün içerisinde elden beslenmeye alıştıkları ve ilk 2 ay içerisinde insanla yüzmeye başladıkları, 6 ay içerisinde de terapi amaçlı kullanılabilirdiği belirlenmiştir.

Beslenme: Tesislerdeki deniz memelilerinin beslenmesinde genellikle kış aylarında deniz memelilerinin yağlanması sağlamak için uskumru, istavrit, kolyoz, sardalya, ringa gibi yağlı balıklar ile Norveç somon filetosunun kullanıldığı, yaz aylarında ise daha yağsız balıkların tercih edildiği ayrıca Norveç'ten ithal edilen capelin (*Mallotus villosus*) adlı yağsız bir balığında kullanıldığı tespit edilmiştir.

Günlük yem tüketimlerinin yunuslar ve foklarda yaz aylarında 8 kg (3-5 öğün olarak) kış aylarında 12 kg, deniz aslanının ve morsun ise 20 kg olduğu belirlenmiştir.

Yaşam ortamları: Tesislerde deniz memelilerinin bulunduğu barınma ortamları ya havuz şartları yada denizde yerleştirilmiş kafes şartlarından oluşmaktadır. Tesislerin tamamında deniz memelilerin daimi olarak bulunduğu alanlar, şov havuzları, terapi havuzları ve karantina havuzları mevcuttur. Deniz ortamları Milli Emlak Genel Müdürlüğü'nden kiralanarak, paslanmaz kafeslerden çevrilerek oluşturulmuştur. Deniz ortamındaki tesislerde su sıcaklığının yaz sezonunda maksimum 28 °C, kış sezonunda minimum 16 °C arasında değiştiği, su kalitesinin kontrolü için periyodik olarak bakteriyolojik, mikrobiyolojik ve fiziksel analizlerinin yapıldığı ve kayıt altına alındığı belirlenmiştir. Havuz ortamlarındaki barınma yerlerindeki su sıcaklığının yaz aylarında artması durumunda tesislerde soğutma sistemlerinin olduğu, sistemdeki suyun 3 saatte bir değiştiği, sistemde otomatik klor miktarı düzenleyicisinin bulunduğu, bu sayede klor düzeyinin 0.5 ile 0.8 arasında sabit tutulduğu, PH'sinin 7.2-7.6 arasında tutulduğu ve sistemdeki suyun kum filtreleri tarafından temizlendiği, klorun yanı sıra ozonunda kullanıldığı belirlenmiştir. Deniz ortamlarındaki barınma yerlerinin derinliği 8-12 m, havuz

ortamlarının ise ortalama 4 m olduğu tespit edilmiştir.

Sağlık koşulları: Tesislerdeki deniz memelileri eğitmenleri ve veterinerler tarafından her gün rutin olarak sağlık kontrollerinin yapıldığı ve bulunan değerlerin kayıt altına alındığı, ayda 3 kez kan parametrelerinin kontrol edildiği, 6 ayda bir ise genel check-up yapıldığı belirlenmiştir.

Her gün düzenli olarak deniz memelilerine besinlerinin içerisinde vitamin verilmektedir. Kullanılan vitaminlerin Essentiale Fort N (karaciğer için), imuneks (immün sistem için), Reflor (bağırsaklar için), Neurovit (B₁, B₆), Seatabs, Centrum (Multivitamin), Folbiol (Folik asit - gebelik dönemi için), Supradyn, Sefola, Sfolin, Megadyn, Apikobal ve Ester olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik olarak amoklavın ve ciflosin, mantar için de fluzole'nin kullanıldığı belirlenmiştir.

TARTIŞMA

Yapılan araştırmada gösteri ve terapi amaçlı kullanılan deniz memelilerin yaşama ortamları, beslenme durumları, sağlık koşulları, biyolojik ve morfometrik parametreleri belirlenmeye çalışılmıştır. 2007 yılında yapılan bu çalışmada ülkemizde 8 tesis tespit edilmiş, tamamı değerlendirmeye alınmış ve bu tesislerde toplam 35 yunus, 6 fok, 3 beyaz balina, 1 deniz aslanı ve 1 mors belirlenmiştir. 2010 yılı itibari ile Sualtı Araştırmaları Derneği Deniz Memelileri Araştırma Grubunun hazırlamış olduğu raporda İstanbul, Alanya ve Bursa'da açılan yeni 3 adet tesisle birlikte tesis sayısı 11'e çıkmıştır. Bu tesislerde bulunan yunus sayısı 45 adete, fok sayısı 21 adete çıkarken, beyaz balina sayısı aynı, deniz aslanı sayısı 2'ye mors sayısı da 3 adete çıkmıştır (Anonim 2010).

Terapi ve gösteri amaçlı tesislerde bulunduran yunusların % 72'nin erkek bireylerden oluşması, bu amaçlar için kullanılan yunuslarda erkek bireylerin daha tercih edildiğini göstermektedir.

Tesislerde çalışan personelin neredeyse tamamı yabancı uyruklulardan oluşmaktadır. Ülkemizde deniz memelilerinin bakımı, eğitimi gibi konularla ilgili personel yetiştirecek hiçbir kurum bulunmamaktadır. Bu gibi tesislerde yardımcı eleman olarak Türk personel çalıştırılması zorunlu hale getirildiği takdirde, tecrübeli eğitmenlerden yararlanılabileceği ve böylece ülkemizde de bu konuda yetişmiş eleman açığı kapanacağı düşünülmektedir.

Araştırma boyunca incelenen tesislerden sadece birinin tamamen zihinsel ve bedensel engelliler terapisini sağlamak üzere kurulduğu, diğer tesislerin ise genel olarak şov amaçlı fakat ilave olarak zihinsel ve bedensel engellilere hizmet verme amacıyla kurulmuş olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalar, uzman terapistler kontrolünde yunusla yapılan terapilerin engellilerin tedavisinde oldukça etkili bir yöntem olduğunu göstermesine rağmen bu gibi tedavilerin daha bilimsel çalışmalarla desteklenmesi gerektiği düşünülmektedir. Tedavi ettiği hala tartışılan "yunus terapi" programlarının yunusların yanı sıra hasta aileleri de maddi ve ruhsal yönden sömürdükleri söylenmektedir. Brakes ve Williamson (2007)'in hazırlamış oldukları raporda bu konuda da insanların kandırıldığı, yöntemin hiçbir bilimsel dayanağının olmadığını belirtmişlerdir.

Bazı tesislerin karada, bazı tesislerin ise deniz ortamındaki askıda kalan havuzlar şeklinde olduğu belirlenmiştir. Deniz memelilerinin karadaki tesislerde barındırılmasının yerine, Marmaris'deki tesis gibi doğal ortamına daha yakın deniz ortamında yapılan tesislerde barındırılması gerektiği düşünülmektedir. Ayrıca ülkemizdeki tesislerin hem gösteri hem de terapi amaçlı değil, sadece terapi veya sadece gösteri amaçlı olması gerektiği düşünülmektedir.

Tarım ve Köyişleri Bakanlığı'nın ilgili personelleri tarafından düzenli olarak yapılan deniz memelileri terapi ve gösteri merkezlerinin denetimi daha aktif hale getirilmesi gerekmektedir. Aynı zamanda, herhangi bir nedenle ölen deniz memelilerinin yerine yasal olmayan yollarla avlanan deniz

memelilerinin değiştirilmemesi için deniz memelilerin markalanması ve elektronik künye takılması gerektiği düşünülmektedir.

Deniz memelileri gösteri merkezlerinde engelli bireyler için yapılan tedavilerin yararlı olup olmadıkları, diğer evcil hayvanlarla yapılan terapilerin hastalar için daha güvenli ve masrafsız ve aynı etkiyi göstermesine rağmen neden özellikle yunusların tercih edildikleri, deniz memelilerin barınma ve yaşam ortamlarının uygun olup olmadığı veya bu deniz canlılarının tutsaklığı hakkında olumlu ve olumsuz birçok yayın bulunmaktadır (Birch, 1995; Nathanson ve ark., 1997; Birch 1998; Lukina, 1999; Lysenko ve ark., 2000; Heimlich 2001; Brakes ve Williamson, 2007; Marino ve Lilienfeld, 2007).

Terapi ve gösteri merkezlerinde bulunan deniz memelilerinin doğadan yakalanması, bu canlıları doğal ortamlarından koparıp tutsak edilmesi, her ne kadar bu canlıları belli amaçlara hizmet ettiriyor olsalar da koruma altındaki bu canlılar doğal ortamlarında sosyal bir topluluk oluşturdukları unutulmamalıdır.

Sonuç olarak, dünyada gösteri ve tedavi amaçlı böyle bir sektör bulunmakta ve hızla sayıları artmaktadır. Ülkemizde de bu tesislerin standartlarının belirlenmesi, mevcut tesislerin belirlenen standartlar dahilinde iyileştirilmesi, hayvan refahının en üst düzeyde tutulması ve bu konuda bilimsel çalışmaların artırılması gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 1973. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. USA.
- Anonim, 1979. Bern Convention on the Conservation of European Wildlife and Natural Habitats.
- Aydın M., Gündoğdu M., Yahşi RS., 2008. Ülkemizde Yunus Yakalanması ve Kullanımı. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Teknik Rapor. s: 16.
- Bengil F., Kankuş J., Sönmez R., Danyer E., Sevim M., Tamtürk Z., 2010. Havuz Tutsakları "Yunuslar". Sualtı

- Araştırmaları Derneği, Deniz Memelileri Araştırma Grubu. Rapor. s: 53.
- Birch S., 1995. "EEG measurements taken as putative indicators of hormonal expression in vivo". Prince Henry's Institute of Medical Research, 3rd Annual Scientific Symposium. Hormones and the Brain.
- Birch S., 1997. Dolphin-human interaction effects. Doctor Thesis at Dept. of Electrical & Computer Systems Engineering, Monash University, Caulfield Campus.
- Birch S., 1998. Dolphin sonar pulse intervals and human resonance characteristics. Bio electromagnetism, Proceedings of the 2nd International Conference 141-142. DOI: 10.1109/ICBEM.1998.666435
- Brakes P., Williamson C., 2007. Dolphin Assisted Therapy: can you put your faith in DAT? Whale and Dolphin Conservation Society. s: 21.
- Cole DM., 1996. Phenomenological effect of dolphin interaction on humans. International Symposium on Dolphin Healing. Co-hosted by the Aqua Thought Foundation. 1-7.
- Heimlich K., 2001. Animal-assisted therapy and the severely disabled child: a quantitative study. J. Rehabil. 67.
- Lukina LN., 1999. Influence of dolphin-assisted therapy sessions on the functional state of children with psychoneurological symptoms of diseases. Human Physiology, 6, 676-679.
- Lysenko VI., Zagoruichenko IV., Batozsky JK., 2000. The usage of the dolphin therapy in the rehabilitation of children .Material of the 6-th Congress of Pediatricians of Russia «Urgent states of children». Moscow, 177-178.
- Marino L., Lilienfeld OS., 2007. Dolphin assisted therapy: More flawed data and more flawed conclusions, Anthrozoös, 3, 239 – 249.
- Nathanson DE., 1989. Using Atlantic bottlenose dolphins to increase cognition of mentally retarded children. In: Lovibond, P. and Wilson, P. (eds.). Clinical and Abnormal Psychology. Elsevier Science Publishers, North Holland, 223-242.
- Nathanson DE., Faria S., 1993. Cognitive improvement of children in water with and without dolphins. Anthrozoös, 1, 17–29.
- Nathanson DE., Castro D., Friend H., McMahon M., 1997. Effectiveness of short-term dolphin-assisted therapy for children with severe disabilities. Anthrozoös, 10, 90-100.
- Smith BA., 1981. Using dolphins to elicit communication from a autistic child. School of Public Affairs and Services, Library at Dolphins Plus, Florida. s: 154.
- Voorhees R., 1995. The effect of a unique stimulus (swimming with dolphins). On the communication between parents and their children with disabilities. Masterwork. University of Miami, School of Medicine.



Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey

Emre OZAN¹, Hatice Mahur TURAN², Harun ALBAYRAK^{2✉}, Abdullah CAVUNT¹

1. Virology Laboratory, Veterinary Control and Research Institute, Samsun.

2. Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Ondokuz Mayıs University, Samsun.

Abstract: The aim of this study was to determine the pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus using serological methods in goats and sheep in Samsun Province. For this purpose, blood samples randomly collected from 144 sheep and 50 goats were analysed for the presence of antibodies against pestiviruses, BTV and PPRV using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Since pestiviruses cause persistent infection, antigen tests have also been performed for this agent. Seropositivity rates in sheep were detected as zero %, 3.47 % and 90.27 % for BTV, PPRV and pestiviruses, respectively. In addition, the pestivirus antigen was detected in three samples of sheep sera. Positivity rates for infections in goats varied and were as follows: BTV 4 %, PPRV 2 %, and pestiviruses 10 %. However, no pestivirus antigen was detected in goats. The results revealed that pestiviruses are more common than other infectious agent in Samsun province of northern Turkey.

Key words: BTV, BVDV, Goat, PPRV, Sheep.

Samsun İlindeki Küçük Ruminantlarda Pestivirus, Mavidil Virusu ve Küçük Ruminant Vebası Virusunun Serolojik Olarak Belirlenmesi

Özet: Bu çalışmada, Samsun ilindeki koyun ve keçilerde pestivirus, mavidil virusu ve küçük ruminant vebası virusunun serolojik yöntemlerle belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, Samsun ilinden rastgele toplanan 144 koyun ve 50 keçi serumu enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) testi ile pestivirus, mavidil virusu ve küçük ruminant vebası virusu yönünden test edildi. Pestivirusların persistens özelliğinden dolayı antijen-ELISA testi de yapıldı. Koyunlarda PPR için % 3.47, pestivirus için % 90.27 seropozitiflik saptanmasına karşın, mavidil yönünden antikor cevabı tespit edilemedi. Üç adet koyun serumunda ise pestivirus antijeni tespit edildi. Keçilerde mavidil için % 4, PPR için % 2, pestivirus için ise % 10 seropozitiflik saptandı. Keçi serumlarının hiçbirinde pestivirus antijeni saptanamadı. Sonuçlar, pestivirusların Samsun ilinde diğer enfeksiyon etkenlerinden daha yaygın olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: BTV, BVDV, Keçi, PPRV, Koyun.

INTRODUCTION

Bluetongue (BT) is a vector-borne disease of ruminants disseminated in the tropic and subtropic zone of the world. All pestiviruses are important pathogens causing economic losses in cattle, sheep and pigs. Peste des petits ruminants (PPR) is a contagious viral disease of the domestic and wild ruminants. Bluetongue (BT) is an insect-borne disease of ruminants caused by an *arbovirus* and transmitted by haematophagous midges of the genus *Culicoides*, family *Ceratopogonidae*. The BT virus (BTV) is the prototype species of the genus *Orbivirus*, family *Reoviridae* and occurs almost globally between latitudes 35 °S and 50 °N. Sheep and some species of deer frequently become clinically ill as a result of BTV infection. The disease can cause up to 100 % morbidity in sheep with 0–50 % case fatality rates (Schwartz-Cornil et al., 2008). Goats, cattle and wild ruminants generally remain asymptomatic, although the northern European strain of BTV-8 has also caused a low but significant level of clinical signs and mortality (<1 %) in cattle (Koumbati et al., 1999; Szymaragd et al., 2007). At least 24 immunologically distinct serotypes of the virus are known (Roy, 2002); the serotypes present in the Mediterranean basin are BTV-1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, and 16 (Mellor and Wittmann, 2002). Of these BTV-4, BTV-9 and BTV-16 have most recently been isolated in Turkey (Erturk et al., 2004).

PPRV (order *Mononegavirales*, family *Paramyxoviridae*, subfamily *Paramyxovirinae*, genus *Morbillivirus*) is an acute and highly contagious virus of small ruminants, which is characterized by high fever, ocular and nasal discharge, pneumonia, necrosis and ulceration of the mucous membrane and inflammation of the gastrointestinal tract leading to severe diarrhea (Dercksen et al., 2007). Morbidity and mortality risks in small ruminants vary but can be as high as 100 % and 90 % respectively. These risks are usually lower in endemic areas and mortality can be as low as 20 % maintained in the young animals unless complicated with other

concurrent infections (Dercksen et al., 2007; Albayrak and Alkan, 2009). A number of serological and molecular diagnostic tests are used for the identification of PPR virus, including competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA), immunocapture enzyme-linked immunosorbent assay (IC-ELISA), agar gel immunodiffusion (AGID), polymerase chain reaction (PCR), isolation on cell culture and hemagglutination inhibition (Anonymous, 2009b). The c-ELISA has a higher specificity (98.4 %) and sensitivity (92.4 %) than the VNT. The sensitivity of c-ELISA for PPRV infection increases to 95.4 %, if the target population is not vaccinated (Singh et al., 2004).

The genome of pestivirus consists of a single stranded positive-sense linear RNA which is about 12.5 kb in size. Pestiviruses are small enveloped-RNA viruses within the family *Flaviviridae*. The genus pestivirus consists of four accepted species: border disease virus (BDV), bovine viral diarrhoea virus (BVDV-1, BVDV-2), classical swine fever virus and a tentative giraffe species (Heinz et al., 2000). Infection with pestiviruses can result in severe economic and reproductive losses. Many studies have shown that pestiviruses are not highly host-specific. It has been reported that BVDV can infect not only cattle but also sheep, swine, goat, deer and giraffe; BDV infects sheep, swine and goats (Paton, 1995). Clinical signs of border disease in sheep include barren ewes, abortions, malformations, stillbirths, and the birth of small weak lambs and persistent infections of the offspring. Affected lambs can show tremor, abnormal body conformation and hairy fleeces (so-called 'hairy-shaker-' or 'fuzzy' lambs syndrome). BDV have also caused mucosal disease-like lesions in sheep (Monies et al., 2004).

The objective of this study was to serologically determine the PPRV, BTV and pestiviruses in sheep and goats in Samsun province of Turkey.

MATERIALS and METHODS

Blood samples were collected from sheep and goats, without clinical signs of the disease from Samsun province in the northern part of Turkey between June and October 2010. The age of the animals varied from 1 to 5 years. Blood samples were taken from the jugular veins of the animals. Blood tubes (without EDTA) were centrifuged at $3,000 \times g$ for 10 min, and the serum samples were transferred to sterile tubes and stored in -20°C until used. The commercial ELISA kits were obtained from Institut Pourquier, Montpellier, France, for BTV and pestivirus antibody and antigen. All the tests were performed according to the producers's description. Plates were read with an ELISA reader at 450 nm. Results were calculated. Blood samples were tested for the detection of antibodies against to PPRV by a commercial c-ELISA kit (Biological Diagnostic, UK). The ELISA was performed according to the manufac-

turer's instructions as described elsewhere (Anderson et al., 1991).

RESULTS

Totally, sera samples of 144 sheep and 50 goat were tested for the presence of antibodies from BTV, PPRV and pestiviruses by ELISA. Seropositivity rates in sheep were detected as zero %, 3.47 % and 90.27 % for BTV, PPRV and pestiviruses, respectively. In addition, the pestivirus antigen was detected in three sheep serum samples. Positivity rates for infections in goats varied and were as follows: BTV 4.0 %; PPRV 2.0 %; pestiviruses 10.0 %, however no pestivirus antigen was detected in goats. The seroprevalence rate for pestivirus specific antibodies was significantly higher in sheep (90.27 %) than in goats (10.0 %) (Table 1). Use of the Chi-square test to determine significance of sheep was more susceptible for pestivirus infection than goats ($p < 0.01$).

Table 1. The number and ratio of BTV, PPRV and Pestivirus seropositive animals

Tablo 1. BTV, PPRV ve Pestivirus seropozitif hayvanların sayıları ve oranları

Animals	No. of serum samples	No Positive (%)			
		BTV	PPRV	Pestivirus Ab	Pestivirus Ag
Sheep	144	zero (-)	5 (3.47)	130 (90.27)	3 (2.08)
Goat	50	2 (4.0)	1 (2.0)	5 (10.0)	0 (-)
Total	194	2 (1.03)	6 (3.09)	135 (69.58)	3 (1.54)

DISCUSSION

Small ruminant production in Turkey is gaining more importance with the reasons of decreasing number of animals, increase in meat prices and more demand on small animal meat. Some viral agents are big threats to this sector. ELISA is a simple, sensitive, rapid test; modifications of ELISA are most widely used for antibody and antigen detection (Anonymous, 2009a). The c-ELISA has been reported as the test of choice for BT diagnosis, it is always more sensitive than the agar gel immunodiffusion test (AGID), the modified complement fixation test, and the plaque neutralization tests and as well as

indirect ELISA in the detection of BTV antibodies (Afshar et al., 1987; Osburn, 1994). BT, PPR and pestiviruses are important viral diseases in domestic small ruminants. These diseases share more or less a similar pattern of geographic distribution with high seroprevalence in the target species, sheep and goats. These diseases are responsible for a significant economic loss in sheep and goat productivity in the endemic regions (Heinz et al., 2000; Singh et al., 2004; Dercksen et al., 2007).

BTV infection of ruminants are commonly seen in most of the tropical and subtropical regions between 35° south and 40° north latitudes, in which

Culicoides midges are extremely effective (Gibbs and Greiner, 1994). Serological studies carried out in the world show that prevalence of BTV infections ranged from 1.6 to 50 % between countries (Gibbs and Greiner, 1985; Tamayo et al., 1985). Many studies have been performed in different parts of Turkey for BTV. The BTV infection has been intensively seen in the south (Mediterranean region), southeastern, west (Aegean region) and northwestern (Marmara region) of Turkey. In Turkey, seroprevalance in the flock of sheep and goats varies from region to region. Burgu et al. (1992) performed a serosurvey among sheep in the south, Southeast and Aegean region, the proportion found as 25.5 %. Bolat (1986) found 7.29–16.23 % seropositivity in the sheep in the East and Southeast and Erturk (1994) detected zero–42 % in sheep in Southeast Anatolia. It was reported that 14.5 % of sampled animals among goats have BT virus specific antibodies in eastern and Southeastern regions of Turkey (Ataseven et al., 2006). It was announced that BTV seroprevalance was 49.8 % in sheep in Kirikkale district of Turkey (Azkur et al., 2011). Albayrak and Ozan (2010) found 3 % seropositivity in sheep in the middle Blacksea region. Okur-Gumusova et al. (2006a) detected 2.44 % seropositivity rate in sheep in the middle Blacksea region. It was reported that seroprevalance is between 1.5 % and 17.1 % in sheep flocks in Burdur and Konya districts of Turkey, respectively (Bulut et al., 2006). They also reported that seropositivity rate in goats is 60 %.

The seroprevalance (zero % and 4 % for sheep and goats, respectively) detected in this study is lower than previously reported studies in Turkey, but our results were found to be similar in the same region (Okur-Gumusova et al., 2006a; Albayrak and Ozan, 2010). The reason can be the season of the sampling that was done in June. In June the flying period of *Culicoides* is just starting. Reservoir–vector–climate trio was very important at the epidemiology for the all mosquito-borne viruses.

Given are average annual values of heat, humidity, and rainfall of Aegean region (western) [16.3 °C (6.4–26.8 °C), 63.2 %, 725.9 mm³] and Blacksea region (northern) [13.0 (4.2–22.1), 71 %, 842.6 mm³]; additionally, annual heat changes are more dramatic in Blacksea region (Anonymous, 2010). Higher vector activity cause to increase in vector-dependent diseases. Climate conditions of western, central and southern parts of Turkey were more suitable for mosquitoes than northern part of Turkey. It is commonplace knowledge that the result of the seroprevalance studies are influenced by many factors such as the number of sampled animals, the age of the animals, the time of sampling, the conditions of care and feeding, individual differences and so on.

Seroprevalance of pestiviruses in the flock of sheep and goats varies from region to region in Turkey, but the average percentage is between 5.7 % and 64.6 %. The seroprevalance rates of pestiviruses were found as 64.6 % in aborted sheep and 5.7 % in aborted goats in Burdur region by Hasircioglu et al. (2009), 42.8 % in aborted sheep by Burgu et al. (1987), and 18.94 % in healthy sheep by Okur-Gumusova et al. (2006b).

Serological studies carried out in the world show that prevalence of pestivirus infections ranged from five to 50 % between countries and from region to region within countries (Nettleton et al., 1998). The seroprevalance of pestiviruses (90.27 % and 10.0 % for sheep and goats, respectively) detected in this study is higher than the previously reported studies. This situation could be explained with the factors causing increase in the virus resistance such as keeping sheep and goats in crowded and insufficient aerodynamic conditions, making animal breeding in primitive conditions, stress, insufficient feeding, knowledge inadequacy in the animal owners with regard to preventive medicine, animal movements from one place to another place and inadequacy of periodic laboratory investigations. In several countries in Europe

compulsory and voluntary eradication programs exist for BVDV in cattle herds (Greiser-Wilke et al., 2003). No BDV control programs for sheep have been described in Europe. However, border disease is considered an economically important disease in sheep farming (Nettleton et al., 1998). No vaccination, eradication and control programme for pestiviruses are present in Turkey.

Pestiviruses are frequent contaminants of modified live virus vaccines produced on primary ovine and bovine cells (Thabti et al., 2002). Many live vaccines used for control peste des petits ruminants, sheep and goat pox, etc may play a role in pestivirus maintenance and/or dissemination in the region. Serological studies carried out in the Middle east and Africa show that prevalence of PPRV infection varies between 5.8 % and 57.3 % (Taylor, 1979; Lefevre et al., 1991). In Turkey, seroprevalance in the flock of sheep and goat varies from region to region, but the average percentage is between 8.39 % and 47.17 % in healthy flocks. The seropositivity rates were detected 29 % and 24 % in sheep and goats, respectively. (Ozkul et al., 2002; Tatar et al., 2002). The seroprevalance (3.47 % and 2.0 % for sheep and goats, respectively) detected in this study is lower than the seroprevalance (14.9 %) reported by Albayrak and Alkan (2009) for the Blacksea region. We know that seroprevalance values of similar infections may be effected by various factors such as the number of sampled animals, population size, age of the animals, time of sampling, management the conditions, climatic and geographical features of the territories, individual differences. In this respect, when the results of these two studies were evaluated extensively, similar findings were found about the existence/prevalance of infection in this area. In conclusion, the results of investigation indicate that pestivirus is more widespread in sheep and goats than other diseases (BT and PPR) in Samsun province and reveal that pestivirus infections have to be considered as one of the major pathogens.

REFERENCES

- Afshar A., Thomas FC., Wright PF., Shapiro JL., Shettigara PT., Anderson J., 1987. Comparison of competitive and indirect enzyme linked immunosorbent assay for detection of bluetongue virus antibodies in serum and whole blood. *J. Clin. Microbiol.*, 25, 1705-1710.
- Albayrak H., Alkan F., 2009. PPR virus infection on sheep in Blacksea region of Turkey: Epidemiology and diagnosis by RT-PCR and virus isolation. *Vet. Res. Commun.*, 33, 241-249.
- Albayrak H., Ozan O., 2010. Seroprevalance of some arboviral infections transported blood sucking insects in ruminants and equids in middle Blacksea region in Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 16, 33-36.
- Anderson J., Mckay JA., Butcher RN., 1991. The use of monoclonal antibodies in competitive ELISA for the detection of antibodies to rinderpest and peste des petits ruminants viruses. In: *The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa phase one IAEA-TECDOC-623*, pp. 43-53.
- Anonymous, 2009a. Bluetongue and Epizootic Haemorrhagic Disease, http://www.oie.int/fileadmin/eng/Health_standards/tahm/2.01.03_BLUETONGUE.pdf. [Accessed: 06.02.2011].
- Anonymous, 2009b. Manual, chapter 2.7.11 in the manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Peste des petits ruminants. http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.07.11_PPR.pdf. [Accessed: 20.05.2010]
- Anonymous, 2010. Update on average annual values of heat, humidity, and rainfall. <http://www.dmi.gov.tr/tahmin/il-ve-ilceler.aspx>. [Accessed: 06.10.2010].
- Ataseven VS., Ataseven L., Tan T., Babur C., Oguzoglu TC., 2006. Sero-positivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and South-eastern Anatolia, Turkey. *Rev. Med. Vet.*, 157, 545-550.
- Azkur AK., Gazyagci S., Aslan ME., 2011. Serological and epidemiological investigation of bluetongue, maedi-visna and caprine arthritis-encephalitis viruses in small ruminant in Kirikkale district in Turkey. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 17, 803-808.

- Bolat Y., 1986. Elazig, Diyarbakir ve Sanliurfa illerinde koyunların mavidil hastalığının yayılması üzerine serolojik araştırmalar. *Selçuk Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1, 103-112.
- Bulut O., Yavru S., Yapık O., Simsek A., Kale M., Avcı O., 2006. Serological investigation of bluetongue virus infection by serum neutralization test and ELISA in sheep and goats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 50, 305-307.
- Burgu I., Ozturk F., Akca Y., Toker A., Frey HR., Liess B., 1987. Investigations on the occurrence and impact of bovine viral diarrhoea (BVD) virus infections in sheep in Turkey. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 94, 292-294.
- Burgu I., Urman HK., Akca Y., Yonguc A., Mellor PS., Hamblin DC., 1992. Serologic survey and vector surveillance for Bluetongue in Southern Turkey. In "Bluetongue, African Horse Sickness and related Orbiviruses", Ed., TE Walton, BI Osburn, CRC Press, Boca Raton.
- Dercksen D., Nibbelink NG, PoauWe R., Backx A., van Rijn P., Vellema P., 2007. First outbreak of bluetongue in goats in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneesk.*, 132, 786-790.
- Erturk A., 1994. Çeşitli serumlarda (koyun, keçi, sigir) mavidil antikorlarının agar-jel presipitasyon testi ile araştırılması. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.*, 7, 1-19.
- Erturk A., Tatar N., Kabaklı O., Incoglu S., Cizmeci SG., Barut FM., 2004. The current situation of bluetongue in Turkey. *Vet. Ital.*, 40, 137-140.
- Gibbs EP., Greiner EC., 1985. Serological observations on epidemiology of bluetongue virus infections in the Caribbean and Florida. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 178, 563-570
- Gibbs EP., Greiner EC., 1994. The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immunol. Microb.*, 17, 207-220.
- Greiser-Wilke I., Grummer B., Moennig V., 2003. Bovine viral diarrhoea eradication and control programmes in Europe. *Biologicals*, 31, 113-118.
- Hasircioglu S., Kale M., Acar A., 2009. Investigation of pestivirus infections in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 15, 163-167.
- Heinz FX., Collet MS., Purcell RH., Gould EA., Howard CR., Houghton M., Moormann RJM., Rice CM., Thiel HJ., 2000. Family Flaviviridae. In "Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses", Eds., MHV Regenmortel, CM Fauquet, DHL Bishop, E Carstens, MK Estes, S Lemon, J Maniloff, MA Mayo, D McGeogch, CR Pringle, RB Wickner, Academic Press, San Diego.
- Koumbati M., Mangana O., Nomikou K., Mellor PS., Papadopoulos O., 1999. Duration of bluetongue viraemia and serological responses in experimentally infected European breeds of sheep and goats. *Vet. Microbiol.*, 64, 277-285.
- Lefevre PJ., Diallo A., Schenkel F., Hussein S., Staak G., 1991. Serological evidence of peste des petits ruminants in Jordan. *Vet. Rec.*, 128, 110.
- Mellor PS., Wittmann EJ., 2002. Bluetongue virus in the Mediterranean Basin 1998-2001. *Vet. J.*, 164, 20-37.
- Monies RJ., Paton DJ., Vilcek S., 2004. Mucosal disease-like lesions in sheep infected with Border disease virus. *Vet. Rec.*, 155, 765-769.
- Nettleton PF., Gilray JA., Russo P., Dliissi E., 1998. Border disease of sheep and goats, *Vet. Res.*, 29, 327-340.
- Okur-Gumusova S., Yazici Z., Albayrak H., 2006a. Orta Karadeniz bölgesinde koyunlarda mavidil virus infeksiyonunun serolojik olarak incelenmesi. *Vet. Hek. Mikrob. Dern. Derg.*, 6, 9-11.
- Okur-Gumusova S., Yazici Z., Albayrak H., 2006b. Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Rev. Med. Vet-Toulouse*, 157, 595-598.
- Osburn BI., 1994. The impact of bluetongue virus on reproduction. *Comp. Immunol. Microb.*, 17, 189-196.
- Ozkul A., Akca Y., Alkan F., Barrett T., Karaoglu T., Dagalp SB., Anderson J., Yesilbag K., Cokcaliskan C., Gencay A., Burgu I., 2002. Prevalence, distribution, and host range of peste des petits ruminants virus. *Emerg. Infect. Dis.*, 8, 708-712.
- Paton DJ., 1995. Pestivirus diversity. *J. Comp. Pathol.*, 112, 215-236.
- Roy P., 2002. Orbivirus. In "The Springer Index of Viruses", Eds., CD Tidonna, G Darai, Springer-Verlag, Berlin.

- Schwartz-Cornil I., Mertens PPC., Contreras V., Hemati B., Pascale F., Breard E., Mellor PS., MacLachlan NJ., Zientera S., 2008. Bluetongue virus: virology, pathogenesis and immunity. *Vet. Res.*, 39, 1-16.
- Singh RP., Sreenivasa BP., Dhar P., Shah LC., Bandyopadhyay SK., 2004. Development of a monoclonal antibody based competitive-ELISA for detection and titration of antibodies to peste des petits ruminants (PPR) virus. *Vet. Microbiol.*, 98, 3-15.
- Szmaragd C., Wilson A., Carpenter S., Mertens PP., Mellor PS., Gubbins S., 2007. Mortality and case fatality during the recurrence of BTv-8 in northern Europe in 2007. *Vet. Rec.*, 161, 571-572.
- Tamayo R., Schoebitz R., Alonso O., Wenzel J., 1985. First report of bluetongue antibody in Chile. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 178, 555-558.
- Tatar N., Erturk A., Kabaklı O., Akkoca N., Incoglu S., Ulker U., Dakman A., 2002. Turkiye'de küçük ruminantların vebasinin (peste des petits ruminants) serolojik olarak prevalansının belirlenmesi. *Etlik Vet. Mikrob. Derg.*, 13, 15-31.
- Taylor WP., 1979. Serological studies with the virus of peste des petits ruminants in Nigeria. *Res. Vet. Sci.*, 26, 236-242.
- Thabti F., Fronzaroli L., Dlissi E., Guibert JM., Hammami S., Pepin M., Russo P., 2002. Experimental model of border disease virus infection in lambs: comparative pathogenicity of pestiviruses isolated in France and Tunisia. *Vet. Res.*, 33, 35-45.



Kıvırcık Koyunlarında Koroner Arterler Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma*

Azime DOĞRUER¹, Erdal ÖZMEN²✉

1. Veteriner Hekim, Antakya-Hatay.
2. Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi ABD, Hatay.

Özet: Bu çalışmada, Kıvırcık koyununda koroner arterlerin makroanatomik özelliklerini ortaya koymak amaçlandı. Araştırmada 14 adet Kıvırcık koyunu kalbi kullanıldı. Koroner damarlara renklendirilmiş latex enjekte edildi. Diseke edilen kalpler incelenerek fotoğraflandı. Kıvırcık koyunlarında kalbin arteriyel vaskularizasyonunun, a. coronaria dextra ve a. coronaria sinistra tarafından sağlandığı gözlemlendi. A. coronaria dextra ve dallarının daha zayıf ve az sayıda septal dal verdiği belirlendi. A. coronaria dextra'nın iki koyunda orijininin sonra iki dala ayrıldığı saptandı. A. coronaria dextra'nın, sulcus coronarius'a yönelen dalının atrial dalları, distal'e yönelen dalının ise ventrikular dalları verdiği tespit edildi. R. distalis atrii dextrii'nin üç kalpte bulunmadığı saptandı. R. marginis ventricularis dextrii ile r. distalis ventriculi dextrii'nin altı kalpte ortak bir kök ile çıktıkları belirlendi. A. coronaria sinistra'nın beş numunede r. interventricularis paraconalis ve r. circumflexus sinister'e ayrıldığı; bu iki dala ilave olarak, dokuz numunede, r. proximalis atrii sinistri, üç materyalde r. septalis, bir numunede ise r. intermedius atrii sinistri'nin a. coronaria dextra'dan ayrıldığı belirlendi.

Anahtar kelimeler: Kıvırcık koyun, Koroner arter, Makroanatomik.

A Macroanatomical Study on the Coronary Arteries of Kıvırcık Sheep

Abstract: The aim of this study was to determine the macroanatomical properties of coronary arteries of Kıvırcık sheep. In this study, 14 Kıvırcık sheep hearts were used as the material. The coronary arteries were filled by the injection of coloured latex. Dissected hearts were evaluated and photographed. Arterial vascularisation of the heart was provided by the left and right coronary arteries. The septal branches from which the right coronary artery and its branches gave off during their course were lesser in number and thinner than the septal branches from which the left coronary artery and its branches gave off during their course. The right coronary artery divided into two branches after its origin in two samples. The branch directed to coronary groove gave off the atrial branches, while the other branch directed distally gave off the ventricular branches. The right distal atrial branches were not observed in three hearts. The right ventricular marginal and distal branches were originated from a common root in six materials. The left coronary artery divided into the paraconal interventricular and left circumflex branches in five of 14 samples. In addition to these two vessels, it gave off the left proximal atrial branch in nine samples, septal branch in three samples and left intermediate atrial branch in one heart.

Key words: Kıvırcık sheep, Coronary artery, Macroanatomy.

✉ Erdal ÖZMEN

Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi ABD, Hatay, e-posta: erdalozmen1968@hotmail.com

* Bu Çalışma Azime Doğruer'in Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Trakya, Marmara'nın doğusu ve Ege bölgesinin bazı illerinde yaygın olarak yetiştirilen kıvırcık koyunu et kalitesi yönünden koyun ırkları arasında Türkiye'de ilk sırada yer alır (Akçapınar, 2000). Kalbin arterial vaskularizasyonu, a. coronaria dextra ve a. coronaria sinistra tarafından sağlanır (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Schummer ve ark., 1981; Karadağ ve Soygüder, 1989).

A. coronaria dextra, aorta'nın başlangıcı düzeyinde valvula semilunaris dextra seviyesinden orijinlenir (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1979; Schummer ve ark., 1981; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989; Tıpırdamaz ve ark., 1996). A. coronaria dextra, truncus pulmonalis ile auricula dextra arasından geçerek, sulcus coronarius'a ulaşır (Müller ve ark., 1964; Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1979; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989). A. coronaria dextra, atrium dextrum için r. proximalis atrii dextri, r. intermedius atrii dextri ve r. distalis atrii dextri'yi; ventriculus dexter için de r. coni arteriosi, r. proximalis ventriculi dextri, r. marginis ventricularis dextri ve r. distalis ventriculi dextri'yi verir (Müller ve ark., 1964; Bhargava ve Beaver, 1970; Dursun, 1979; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989). A. coronaria dextra, inekte septum interventriculare'ye de dallar verir (Bhargava ve Beaver, 1970).

Chakravarthy ve Sastry (1979) keçide, Tıpırdamaz (1987) Akkaraman koyunu ve kıl keçisinde, Karadağ ve Soygüder (1989) Doğu Anadolu Kırmızısı sığırında, a. coronaria sinistra'nın a. coronaria dextra'dan daha kuvvetli bir damar olduğunu bildirmişlerdir. A. coronaria sinistra aorta'nın başlangıcı düzeyinden orijinlenir (Müller ve ark., 1964; Dursun 1978, Schummer ve ark., 1981; Tıpırdamaz ve ark., 1996). A. coronaria sinistra, sulcus coronarius düzeyinde aralarında dik açı oluşturacak biçimde r. circumflexus sinister ile r. interventricularis paraconalis'e ayrılır (Müller ve ark., 1964; Bhargava ve Beaver 1970, Tecirlioğlu ve ark.,

1977; Chakravarthy ve Sastry, 1979; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989). Bu damarın, nadiren, r. circumflexus sinister ve r. interventricularis paraconalis'ten başka, köpekte (Dursun ve Türkmenoğlu, 1996; Tıpırdamaz ve ark., 1996; Bull ve Martins, 2002) ve sığırda (Bhargava ve Beaver, 1970) r. septalis'i verdiği ifade edilmektedir. Ruminantlarda (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989) ve köpekte (Dursun, 1979) r. interventricularis paraconalis, a. coronaria sinistra'dan ayrılır ve apex cordis'e doğru seyredir. R. interventricularis paraconalis orijininin sonra seyri boyunca rr. septi interventricularis (Dursun ve ark., 1996), r. coni arteriosi, r. collateralis sinister proximalis ve r. collateralis sinister distalis'e dallanır (Dursun, 1979; Dursun, 1981; Karadağ ve Soygüder, 1989). R. interventricularis paraconalis'in seyri sırasında septum interventriculare'ye rr. septales isimli dalları verdiği bildirilmektedir (Müller ve ark., 1964; Tecirlioğlu ve ark., 1977; Aksoy ve Karadağ, 2002; Dursun ve ark. 1996). Bull ve Martins (2002) 30 köpekten 15'inde septal arterlerin r. interventricularis paraconalis'ten orijinlendiğini vurgulamaktadırlar.

R. circumflexus sinister, r. interventricularis paraconalis'in başlangıcı seviyesinde a. coronaria sinistra'dan ayrılır (Bhargava ve Beaver, 1970; Tecirlioğlu ve ark., 1977; Tıpırdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989). Köpeklerde r. circumflexus sinister'in nadiren aorta'dan da ayrılabilceği bildirilmektedir (Dursun, 1979; Bull ve Martins, 2002).

R. circumflexus sinister'in atrial dalları; r. proximalis atrii sinistri, r. intermedius atrii sinistri ve r. distalis atrii sinistri'dir (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Schummer ve ark., 1981; Karadağ ve Soygüder, 1989). Dursun (1979), köpekte r. intermedius atrii sinistri'nin bazı numunelerde bulunmadığını bildirmektedir. R. circumflexus sinister, sulcus

interventricularis subsinuosus'ta, r. interventricularis subsinuosus adı ile seyrederek, apex cordis'e ulaşmadan, ventriculus sinister'in duvarı içinde sonlanır ve bu damar r. proximalis ventriculi sinistri, r. marginis ventricularis sinistri ile r. distalis ventriculi sinistri'yi verir (Dursun, 1979; Schummer ve ark., 1981; Tıpırdamaz, 1987; Bull ve Martins, 2002).

Sunulan bu çalışmada, Kıvırcık koyununun daha önce araştırılmayan koroner arterlerinin sabit ve değişken anatomik özelliklerinin ortaya konulması amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Balıkesir ili mezbahanesinden temin edilen 14 adet Kıvırcık koyunu kalbi kullanıldı. Koroner damarlar içine yerleştirilen kanüller vasıtası ile önce çeşme suyu, sonra da distile su ile damarlar temizlendi. Koroner arterlerin demonstrasyonu için, kırmızı kumaş boyası (Goya) ile renklendirilmiş latex, koroner venlerin belirlenmesi için de mavi kumaş boyası (Goya) ile renklendirilmiş latex daha önce yerleştirilen kanüller vasıtası ile enjekte edildi (Ayca ve Bilge, 1984). Kalpler % 10'luk formaldehit solusyonu içinde bir hafta bekletildi. Materyallerin diseksiyonları yapıp fotoğraflandı. Ölçümlerde Verniyer tipi kumpas kullanıldı. Terminolojide Nomina Anatomica Veterinaria (2005) esas alındı.

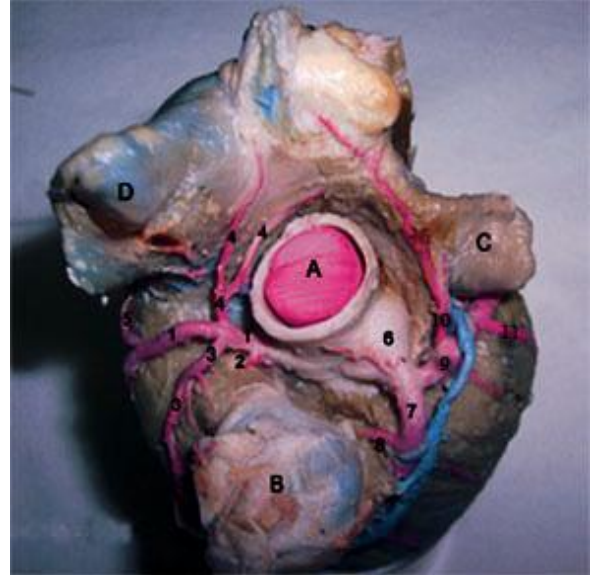
SONUÇ

Kıvırcık koyunlarında kalbin arterial vaskularizasyonunun, aorta'dan orjinlenen a. coronaria dextra (Şekil 1,2/1) ve a. coronaria sinistra (Şekil 1/6, 7/1) tarafından sağlandığı gözlemlendi.

A. Coronaria Dextra

A. coronaria dextra'nın, ostium aorta seviyesinde aorta'dan orjinlendiği (Şekil 1,2/1, 3/6) belirlendi. A. coronaria dextra'nın verdiği septal dalların, a. coronaria sinistra'nın verdiği septal dallardan daha az sayıda ve zayıf olduğu görüldü. A. coronaria

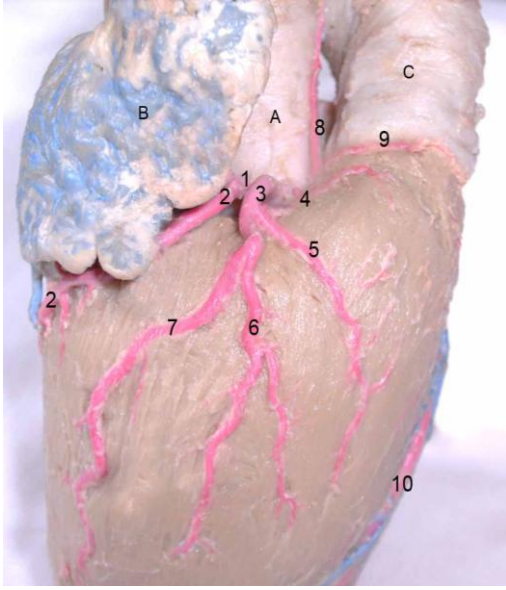
dextra'nın 12 kalpte tek dal ile orjinlenip sonradan iki dala ayrıldığı ve bu dallardan birinin sulcus coronarius'ta seyrederken diğerinin sulcus interventricularis'te seyrettiği tespit edildi. Bu kalplerde atrium dextrum için, r. proximalis atrii dextri, ve r. intermedius atrii dextri'yi; ventriculus dexter için ise r. coni arteriosi, r. proximalis ventriculi dextri, r. marginis ventricularis dextri ve r. distalis ventriculi dextri'yi verdiği belirlendi. Ancak bu dallara ilave olarak, atrium dextrum için, 11 kalpte r. distalis atrii dextri'yi verdiği gözlemlendi. İki kalpte a. coronaria dextra'nın iki ayrı dal ile orjinlendiği belirlendi (Şekil 2/2,3). Bu dallardan sulcus coronarius içinde seyreden atrial dalları; ventriculus dexter üzerinde seyreden ise ventrikular dalları verdiği saptandı.



Şekil 1. A. coronaria dextra ve a. coronaria sinistra ile dalları.

Figure 1. The right and left coronary arteries and their branches.

A- aorta B- truncus pulmonalis, C- auricula sinistra, D- auricula dextra, 1- a. coronaria dextra, 2- a. coronaria dextra'nın r. septalis'i, 3- r. coni arteriosi, 4- r. proximalis atrii dextri, 5- r. intermedius atrii dextri, 6- a. coronaria sinistra, 7- r. interventricularis paraconalis, 8- r. interventricularis paraconalis'in r. septalis'i, 9- r. circumflexus sinister, 10- r. proximalis atrii sinistri, 11- r. proximalis ventriculi sinistri.



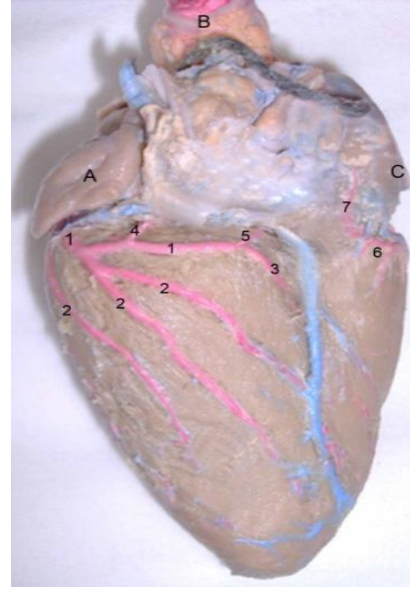
Şekil 2. A. coronaria dextra'nın iki dala ayrılması.

Figure 2. Separated with two branches of the right coroner artery. A- aorta, B- auricula dextra, C- truncus pulmonalis, 1- a. coronaria dextra, 2- a. coronaria dextra'nın, sulcus coronarius'ta seyreden dalı, 3- a. coronaria dextra'nın ventriculus dexter'de seyreden dalı, 4- r. coni arteriosi, 5- r. proximalis ventriculi dextri, 6- r. marginis ventricularis dextri, 7- r. distalis ventriculi dextri, 8- r. septalis'ten ayrılıp aorta'ya giden dal, 9- r. septalis'ten ayrılıp conus arteriosus'a giden dal, 10- r. interventricularis paraconalis.

R. septalis'in, a. coronaria dextra'nın başlangıcından çıktığı (Şekil 1/2) ve ventrikül duvarına girmeden iki dala ayrıldığı belirlendi. Bu dallardan birinin aorta (Şekil 2/8), diğerinin conus arteriosus'ta (Şekil 2/9) dallandığı gözlemlendi.

R. proximalis atrii dextri'nin hem iki dal ile orijinlendiği iki kalpte, hem de tek dal ile ayrıldığı 12 kalpte (Şekil 1/4) sulcus coronarius içinde seyreden dalından, orijinlendiği görüldü. R. proximalis atrii dextri'nin auricula dextra ile aorta arasından caudal'e yöneldiği ve auricula dextra'nın medial yüzünde dağıldığı tespit edildi.

R. intermedius atrii dextri'nin, hem iki dal ile orijinlendiği iki kalpte, hem de tek dal ile ayrıldığı 12 kalpte (Şekil 1/5), a. coronaria dextra'nın sulcus coronarius'ta seyreden dalından başlangıç aldığı tespit edildi. Dört kalpte margo ventricularis



Şekil 3. R. distalis ventriculi sinistri'nin varyasyonu.

Figure 3. The variation of the left ventricular distal branch.

A- auricula sinistra, B- aorta, C- auricula dextra, 1- r. circumflexus sinister, 2- r. distalis ventriculi sinistri, 3- r. interventricularis subsinuosus, 4- r. distalis atrii sinistri, 5- r. ventriculi dextri, 6- a. coronaria dextra, 7- r. distalis atrii dextri.

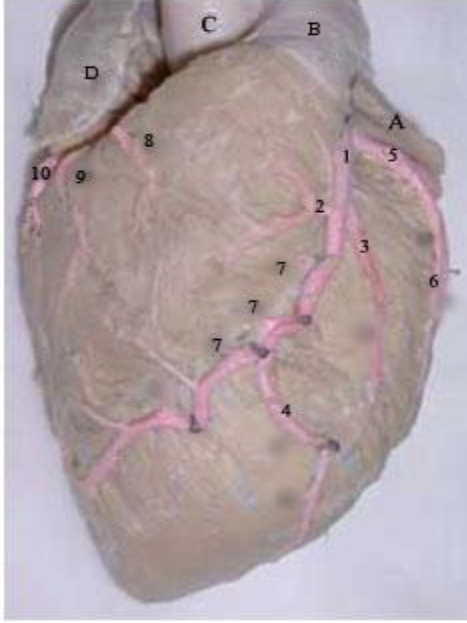
dextra'dan hemen önce, 10 kalpte ise margo ventricularis dextra'yı geçtikten sonra a. coronaria dextra'dan orijinlendiği gözlemlendi (Şekil 1/5). R. intermedius atrii dextri'nin iki numunede, r. proximalis atrii dextri ve r. distalis atrii dextri ile anastomozlaştığı gözlemlendi.

R. distalis atrii dextri, tespit edildiği 11 kalpte a. coronaria dextra'nın dorsal duvarından orijinlendiği (Şekil 3/7), üç kalpte ise bu damarın bulunmadığı belirlendi.

R. coni arteriosi'nin, a. coronaria dextra'dan orijinlenip, conus arteriosus'u beslediği saptandı (Şekil 1/3, 2/4).

R. proximalis ventriculi dextri'nin, a. coronaria dextra'dan orijinlendikten sonra, kalbin orta 1/3'ünde ventriculus dexter'in duvarı içinde sonlandığı belirlendi (Şekil 2/5, 4/9).

R. marginis ventricularis dextri'nin, a. coronaria dextra'dan 14 kalbin sekizinde tek başına, altısında r. distalis ventriculi dextri ile birlikte ayrıldığı tespit edildi (Şekil 2/6). Bu damarın margo ventricularis dexter'e paralel olarak seyredip, ventriculus dexter'in duvarı içinde sonlandığı görüldü. Bir kalpte bahsedilen arterin, r. interventricularis paraconalis'in ventriculus dexter



Şekil 4. R. interventricularis paraconalis ve dalları.

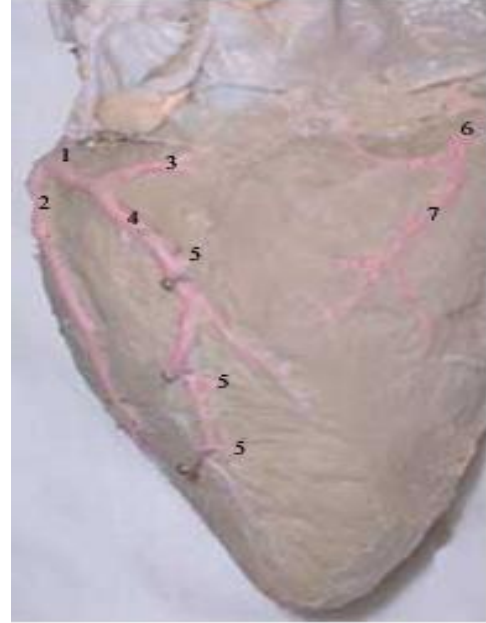
Figure 4. The paraconal interventricular ramus and its branches. A- auricula sinistra, B- truncus pulmonalis, C- aorta, D- auricula dextra, 1- r. interventricularis paraconalis, 2- r. coni arteriosi, 3- r. collateralis sinister proximalis, 4- r. collateralis sinister distalis, 5- r. circumflexus sinister, 6- r. proximalis ventriculi sinistri, 7- rr. septalis, 8- a. coronaria dextra'nın r. coni arteriosi'si, 9- r. proximalis ventriculi dextri, 10- r. marginis ventricularis dextri.

A. Coronaria Sinistra

A. coronaria sinistra'nın, a. coronaria dextra'dan daha kalın ve daha uzun bir seyir gösterdiği, sinus aortae seviyesinde aorta'dan ayrıldığı (Şekil 1/6, 6/1, 7/1) ve truncus pulmonalis ile auricula sinistra'nın arasından geçerek, sulcus coronarius'a ulaştığı görüldü. Bu damarın 14 kalbin tamamında sulcus coronarius ile sulcus interventricularis paraconalis'in birleşme yerinde r. circumflexus sinister (Şekil 1/10) ve r. interventricularis paraconalis'e (Şekil 1/7)

için verdiği dallar ile anastomozlaştığı tespit edildi.

R. distalis ventriculi dextri, a. coronaria dextra'nın ventral duvarından ayrılıp sulcus interventricularis subsinuosus'a paralel bir seyirle distal yönde seyrettiği gözlemlendi (Şekil 2, 5/7). Kalbin orta 1/3 seviyesinde ventriculus dexter duvarına dağılarak sonlandığı tespit edildi.



Şekil 5. R. interventricularis subsinuosus ve dalları.

Figure 5. The subsinuosal interventricular ramus and its branches.

1- r. circumflexus sinister, 2- r. distalis ventriculi sinistri, 3- r. ventriculi dextri, 4- r. interventricularis subsinuosus, 5- rr. septalis, 6- a. coronaria dextra, 7- r. distalis ventriculi dextri.

ayrıldığı belirlendi. A. coronaria sinistra'nın, dokuz kalpte r. proximalis atrii sinistri (Şekil 7/2), üç kalpte r. septalis (Şekil 7/4), bir kalpte ise r. intermedius atrii sinistri'yi (Şekil 7/3) verdiği tespit edildi.

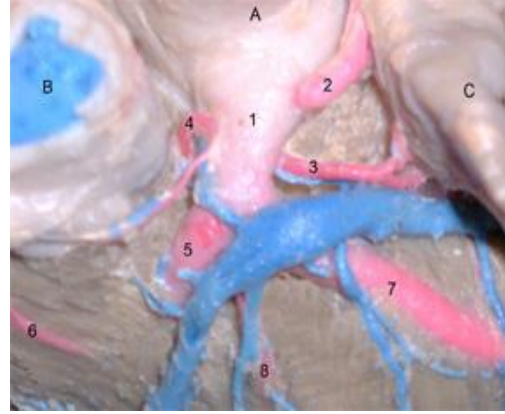
R. interventricularis paraconalis'in, sulcus coronarius ile sulcus interventricularis paraconalis'in birleşme yerinde a. coronaria sinistra'dan ayrıldığı (Şekil 1/7, 4/1, 6/9, 7/5) ve sulcus interventricularis paraconalis'e girdikten 0,5–1 cm sonra 2–2,5 cm'lik kalp kas köprüsü ile örtülü olduğu saptandı. R.

interventricularis paraconalis'in apex cordis civarında iki dala ayrıldığı görüldü. Bu iki daldan ventriculus dexter'e yakın olanının, 4 kalpte, margo ventricularis dexter'i aşarak facies atrialis'e ulaştığı ve r. interventricularis subsinuosus'un uç dalları ile anastomoz yaptığı tespit edildi. Diğer 10 kalpte ise facies auricularis'te apex cordis yakınında sonlandığı gözlemlendi. İkinci dal ise apex cordis yakınında dağılılarak sonlanmaktaydı. R. interventricularis paraconalis'in, 11 kalpte orijininin hemen sonra r. septalis'i (Şekil 1/8), ayrıca sulcus interventricularis paraconalis içindeki seyri boyunca septum interventriculare için çok sayıda ince dal verdiği saptandı (Şekil 4/8). R. interventricularis paraconalis'in, bu dallardan başka, conus arteriosus için r. coni arteriosi, ventriculus sinister için de r. collateralis sinister proximalis ve r. collateralis sinister distalis'i verdiği belirlendi.



Şekil 6. R. circumflexus sinister'in farklı dallanması.

Figure 6. Different branching of the left circumflex branch. A- tr. pulmonalis, B- auricula sinistra, 1- a. coronaria sinistra, 2- r. circumflexus sinister, 3- r. proximalis ventriculi sinistri ile r. marginis ventricularis sinistri'nin ortak kökü, 4- r. proximalis ventriculi sinistri, 5- r. marginis ventricularis sinistri, 6- r. proximalis atrii sinistri, 7- r. intermedius atrii sinistri, 8- r. distalis atrii sinistri, 9- r. interventricularis paraconalis, 10- r. collateralis sinister proximalis.



Şekil 7. R. intermedius atrii sinistri ve r. septalis'in farklı orijinlenmesi.

Figure 7. Different originated of left atrial intermedius branch and septal branch.

A- aorta, B- truncus pulmonalis, C- auricula sinistra. 1- a. coronaria sinistra, 2- r. proximalis atrii sinistri, 3- r. intermedius atrii sinistri, 4- r. septalis, 5- r. interventricularis paraconalis, 6- r. coni arteriosi, 7- r. circumflexus sinister, 8- r. proximalis ventriculi sinistri.

R. coni arteriosi'in, r. interventricularis paraconalis'ten ayrıldıktan sonra 1-3 dal halinde conus arteriosus'a ulaştığı gözlemlendi (Şekil:4/2, 7/6).

R. collateralis sinister proximalis (Şekil 4/3, 6/10) ve **r. collateralis sinister distalis**'in (Şekil 4/4), 13 kalpte, aralarında 1,5-3 cm aralık ile r. interventricularis paraconalis'ten orijinlendiği, her iki damarın, birbirine paralel olarak seyredip, margo ventricularis sinister seviyesinde sonlandığı belirlendi. Bir kalpte ise, r. interventricularis paraconalis'in ventriculus sinister'e giden tek bir dal verdiği ve bu dalın da kısa bir seyirden sonra ikiye ayrılarak, r. collateralis sinister proximalis ve r. collateralis sinister distalis'in vaskularize etmeleri gereken bölgeyi beslediği tespit edildi. R. collateralis sinister distalis'in, septum interventriculare için de septal dallar verdiği belirlendi.

R. circumflexus sinister'in, a. coronaria sinistra'nın sulcus coronarius içindeki devamı olup, auricula sinistra'nın serbest kenarı altından geçerek margo ventricularis sinister'e ulaştığı görüldü (Şekil 1/9, 3/1, 4/5 5/1, 6/2, 7/7). R. circumflexus sinister, seyri esnasında, r. proximalis atrii sinistri, r.

intermedius atrii sinistri, r. distalis atrii sinistri, r. proximalis ventriculi sinistri, r. marginis ventricularis sinistri ve r. distalis ventriculi sinistri'yi verdikten sonra, sulcus interventricularis subsinuosus içinde, r. interventricularis subsinuosus adını alarak seyrine devam ettiği belirlendi. İki kalpte, r. intermedius atrii sinistri'nin bulunmadığı görüldü. Ayrıca r. circumflexus sinister'in, atrium sinistrum'a giden 1–2 ince dal daha verdiği belirlendi.

R. proximalis atrii sinistri'nin dokuz kalpte a. coronaria sinistra'dan (Şekil 6/6, 7/2), dört kalpte r. circumflexus sinister'in dorsal duvarından (Şekil 1/10), bir kalpte ise a. coronaria sinistra ile r. circumflexus sinister'in arasındaki açıdan orijinlendiği görüldü. R. proximalis atrii sinistri'nin, auricula sinistra'nın aorta'ya bakan yüzü boyunca ilerlediği ve 14 kalbin yedisinde atrium sinistrum'un medial yüzünde sonlanırken, diğer yedisinde atrium dextrum'un yakınlarına kadar uzandığı saptandı. R. proximalis atrii sinistri'nin sekiz kalpte caudal yönde ince bir dal verdiği ve bir kalpte caudal'e yönelen bu dal ile r. intermedius atrii sinistri'nin anastomozlaştığı gözlemlendi.

R. intermedius atrii sinistri'nin yedi kalpte r. proximalis atrii sinistri'nin orijininden 0,5–2,5 cm sonra, dört kalpte margo ventricularis sinistri seviyesinde r. circumflexus sinister'den ayrılırken, iki kalpte bulunmadığı, bir kalpte ise a. coronaria sinistra'dan ayrıldığı (Şekil 7/3) tespit edildi. R. intermedius atrii sinistri'nin bulunmadığı kalplerde, bu damarın beslediği bölgenin, r. proximalis atrii sinistri'den ayrılan bir dal tarafından vaskularize edildiği tespit edildi. R. intermedius atrii sinistri'nin bir kalpte r. proximalis atrii sinistri'yle, başka bir kalpte ise r. distalis atrii sinistri ile anastomozlaştığı belirlendi.

R. distalis atrii sinistri'nin, r. circumflexus sinister'in dorsal duvarından ayrılıp, atrium sinistrum, sinus coronarius'un ventral duvarı ve auricula sinistra'nın dorsal yüzünde dağıldığı görüldü (Şekil 3/4, 6/8).

R. proximalis ventriculi sinistri'nin, 11 kalpte r. circumflexus sinister'den (Şekil 1/11, 4/6, 6/4), bir kalpte r. circumflexus sinister ile r. interventricularis paraconalis arasındaki açıdan (Şekil 7/8) ve iki kalpte ise r. marginis ventricularis sinistri ile ortak bir kök oluşturarak (Şekil 6/3) r. circumflexus sinister'den ayrıldığı tespit edildi. Damarın 14 kalbin sekizinde orijininden hemen sonra distal'e yönelerek kalbin alt 2/3 ünü beslediği, altısında ise kalbin orta 1/3'ü civarında ventriculus sinister'in duvarı içinde sonlandığı görüldü. R. proximalis ventriculi sinistri'nin, septum interventriculare'ye ince dallar (Şekil 4/7) verdiği belirlendi. R. proximalis ventriculi sinistri'nin, üç kalpte r. collateralis proximalis sinister, bir kalpte r. collateralis sinister distalis, bir kalpte ise hem r. collateralis sinister proximalis hem de r. marginis ventricularis sinister ile anastomozlaştığı tespit edildi.

R. marginis ventricularis sinistri'nin, 12 kalpte r. circumflexus sinister'den bağımsız olarak (Şekil 4/7) çıktığı, iki kalpte ise r. proximalis ventriculi sinistri ile ortak bir kök (Şekil 6/3) oluşturduğu görüldü. Bu damarın dört kalpte tek dal ile orijinlendikten sonra iki dala ayrıldığı, bir kalpte ise iki ayrı dal ile orijinlendiği belirlendi. R. marginis ventricularis sinistri'nin, bir kalpte r. proximalis ventriculi sinistri ile anastomozlaştığı saptandı.

R. distalis ventriculi sinistri'nin, r. circumflexus sinister'den margo ventricularis sinister seviyesinde başlangıç aldığı gözlemlendi. Damarın 10 kalpte tek dal (Şekil 5/2), iki kalpte iki dal halinde orijinlendiği, diğer iki kalpte ise iki dal olarak orijinlendikten hemen sonra tekrar iki dala ayrıldığı gözlemlendi (Şekil 3/2). R. distalis ventriculi sinistri'nin, r. marginis ventricularis sinistri ile r. interventricularis subsinuosus'un ventriculus sinister için verdiği dallar arasında kalan bölgeyi ve septum interventriculare'yi beslediği belirlendi.

R. interventricularis subsinuosus'un, (Şekil 3/3, 5/4) r. circumflexus sinister'in devamı niteliğinde olduğu, sulcus interventricularis subsinuosus'un başlangıcı seviyesinde r. ventriculi dextrum'ı verdiği

(Şekil 5/3) ve sulcus interventricularis subsinuosus'a yöneldiği tespit edildi.

R. interventricularis subsinuosus'un ventriculus dexter'e 1-4 arasında değişen sayıda dal verirken, septum interventricularis'e de rr. septales'i verdiği belirlendi (Şekil 5/5). R. interventricularis subsinuosus'un dört kalpte r. interventricularis paraconalis, iki kalpte hem r. interventricularis paraconalis hem de r. distalis ventriculi sinistri, iki kalpte ise r. distalis ventriculi dextri ile anastomoz yaptığı saptandı.

R. ventriculi dextri sulcus interventricularis subsinuosus'un başlangıcı seviyesinde r. interventricularis subsinuosus'tan ayrıldığı tespit edildi (Şekil 3/5, 5/3). R. ventriculi dextri'nin orijininden sonra dorsal yönde ilerlediği ve septum interatriale'ye kadar ulaştığı görüldü.

TARTIŞMA

Kalbin arteriyel vaskularizasyonunun literatürlerde (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Schummer ve ark., 1981; Karadağ ve Soygüder, 1989) bildirildiği gibi, bu çalışmada da a. coronaria dextra ve a. coronaria sinistra tarafından sağlandığı ve koroner arterlerin genel dallanma şekillerinin ruminant ve köpek koroner arterleri ile benzeştiği görülmüştür. Dursun (1979) köpekte, Aksoy ve Karadağ (2002) tavşanda ve Chakravarthy ve Sastry (1979) keçide a. coronaria sinistra'nın a. coronaria dextra'dan daha güçlü olduğunu kaydetmişlerdir. Sunulan çalışmada da literatür bildirimlerine paralel olarak a. coronaria sinistra'nın a. coronaria dextra'dan daha güçlü olduğu gözlenmiştir.

A. coronaria dextra'nın çalışmalarda (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1979; Dursun, 1981; Schummer ve ark., 1981; Tıprıdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989) bildirildiği gibi ostium aorta'nın başlangıcında, aorta'dan orijinlendiği tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar (Müller ve ark., 1964; Bhargave ve Beaver, 1970; Tecirlioğlu ve ark., 1977;

Dursun, 1979; Dursun, 1981; Tıprıdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989), a. coronaria dextra'nın tek dal olarak, sulcus coronarius içindeki seyri esnasında dorsal yönde, r. proximalis atrii dextri, r. intermedius atrii dextri ve r. distalis atrii dextri'yi, ventral yönde ise r. conus arteriosus, r. proximalis ventriculi dextri, r. marginis ventricularis dextri ve r. distalis ventriculi dextri'yi verdiğini bildirmektedirler. Sunulan bu çalışmada da 12 kalpte a. coronaria dextra'nın tek dal olarak sulcus coronarius'taki seyri boyunca verdiği dallar, literatür verileriyle uyumlu olduğu, iki kalpte ise literatürlerden farklı olarak, a. coronaria dextra'nın, aorta'dan iki dal ile ayrıldığı belirlenmiştir. A. coronaria dextra'nın, iki dal ile ayrıldığı kalplerde sulcus coronarius'ta seyreden dalından r. proximalis atrii dextri, r. intermedius atrii dextri ve r. distalis atrii dextri orijinlenirken, ventriculus dexter üzerinden distal'e yönelen dalından ise r. conus arteriosus, r. proximalis ventriculi dextri, r. marginis ventricularis dextri ve r. distalis ventriculi dextri'nin ayrıldığı gözlenmiştir. R. intermedius atrii dextri, dört kalpte, araştırmacıların (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1979; Tıprıdamaz, 1987; ve Karadağ ve Soygüder, 1989) bulguları ile uyumlu olarak margo ventricularis dexter düzeyinde, 10 kalpte ise literatürlerden farklı olarak margo ventricularis dexter'den sonra orijinlendiği saptanmıştır. R. distalis atrii dextri'nin 11 kalpte var olduğu, üç kalpte ise bulunmadığı tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada 11 kalpten elde edilen bulgular, Tecirlioğlu ve ark. (1977) ile Dursun (1979)'un bildirimleri ile paraleldir. Yapılan çalışmada Tecirlioğlu ve ark. (1977)'nin mandada, Tıprıdamaz (1987)'in koyundaki bildirimlerine uygun olarak r. conus arteriosus'un a. coronaria dextra'dan orijinlenip, conus arteriosus'a doğru ilerlediği belirlenmiştir. Sunulan çalışmada sekiz kalpte, Tecirlioğlu ve ark. (1977) ile Dursun (1979)'un bildirimlerine uygun olarak r. marginis ventricularis dextri'nin, r. proximalis ventriculi dextri'den sonra bağımsız olarak orijinlenirken, altı kalpte Tıprıdamaz (1987)'in kıl keçisindeki bulguları ile uyumlu olarak r.

marginis ventricularis dextri ile r. distalis ventriculi dextri'nin ortak bir kök ile çıktıkları tespit edilmiştir.

A. coronaria sinistra'nın, truncus pulmonalis ile auricula sinistra arasındaki seyri esnasında, dokuz kalpte r. proximalis atrii sinistri'yi üç kalpte r. septalis'i bir kalpte ise r. intermedius atrii sinistri'yi verdiği belirlenmiştir. Tecirlioğlu ve ark. (1977) mandalarda r. proximalis atrii sinistri'nin nadir de olsa a. coronaria sinistra'dan ayrılabilceğini ifade ederlerken, bazı araştırmacılar da (Aksoy ve Karadağ, 2002; Bhargava ve Beaver, 1970; Dursun ve Türkmenoğlu, 1996; Dursun ve ark., 1996; Büll ve Martins, 2002) r. septalis'in ayrıldığını rapor etmişlerdir. A. coronaria sinistra'nın, sulcus interventricularis paraconalis'in başlangıcında r. circumflexus sinister ve r. interventricularis paraconalis'e ayrıldığı görülmüştür. Elde edilen bu bulgular, bazı araştırmacıların (Müller ve ark., 1964; Bhargava ve Beaver, 1970; Tecirlioğlu ve ark., 1978; Chakravarthy ve Sastry, 1979; Tıprıdamaz, 1987; Karadağ ve Soygüder, 1989) bildirimlerine paralellik göstermektedir. R. interventricularis paraconalis'in seyri boyunca r. septi interventricularis (Dursun ve ark., 1996), r. coni arteriosi, r. collateralis sinister proximalis, r. collateralis sinister distalis (Dursun, 1979; Dursun, 1981; Karadağ ve Soygüder, 1989), rr. septales'i (Dursun ve ark., 1996) verdiği kaydedilmiştir. Bu çalışmada, r. interventricularis paraconalis'in orijini seviyesinde 11 kalpte r. septalis'i verdiği ve sulcus interventricularis paraconalis içindeki seyri boyunca da r. coni arteriosi, r. collateralis sinister proximalis, r. collateralis sinister distalis ve rr. septales'i verdiği belirlenmiştir.

Bazı araştırmacılar (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1981) r. interventricularis paraconalis'in, apex cordis yakınında iki zayıf dala ayrılarak facies auricularis'te sonlandığını ifade etmektedirler. Bhargava ve Beaver (1970) sığırda, Dursun (1979) ile Müller ve ark. (1964) köpekte, Karadağ ve Soygüder (1989) Doğu Anadolu Kırmızısı sığırında r. interventricularis paraconalis'in margo ventricularis dexteri

geçip facies atrialis'e ulaşabildiğini kaydetmektedirler. Bu çalışmada incelenen 10 kalpte, r. interventricularis paraconalis, Tecirlioğlu ve ark. (1977) ile Dursun (1981)'un bildirimlerine uygun olarak facies auricularis'te sonlandığı, dört kalpte ise araştırmacıların (Bhargava ve Beaver, 1970; Dursun, 1979; Müller ve ark., 1964; Karadağ ve Soygüder, 1989) bildirimlerine uygun olarak facies atrialis'e geçtiği ve r. interventricularis subsinuus ile anastomozlaştığı tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada r. coni arteriosi'nin, Tıprıdamaz (1987) ile Karadağ ve Soygüder (1989)'in bildirimlerine uygun olarak r. interventricularis paraconalis'ten ayrıldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmada, 13 kalpte elde edilen bulgular Tecirlioğlu ve ark. (1977) ve Dursun (1979)'un bildirimleri ile uyumlu olarak, r. collateralis sinister proximalis ve r. collateralis sinister distalis'in r. interventricularis paraconalis'ten ayrı ayrı orijinlendiği, bir kalpte ise literatür bildirimlerinden farklı olarak, r. interventricularis paraconalis'ten ventriculus sinister'e giden tek bir dalın ayrıldığı ve bu dalın r. collateralis sinister proximalis ve r. collateralis sinister distalis'in beslemeleri gereken bölgeye dağıldığı gözlenmiştir.

R. proximalis atrii sinistri'nin dokuz kalpte a. coronaria sinistra'dan, dört kalpte r. circumflexus sinister ve bir kalpte ise a. coronaria dextra ile r. circumflexus sinister'in arasındaki açıdan ayrıldığı görülmüştür. Literatürlerde (Dursun, 1979; Karadağ ve Soygüder, 1989; Tıprıdamaz, 1987) ise bu damarın r. circumflexus sinister'den ayrıldığı bildirilmektedir. Ancak Tecirlioğlu ve ark. (1977) r. proximalis atrii sinistri'nin nadir de olsa a. coronaria sinistra'dan ayrılabilceğini ifade etmektedirler. Ayrıca literatür bildirimlerinden farklı olarak bir kalpte a. coronaria sinistra ve r. circumflexus sinister arasındaki açıdan ayrıldığı tespit edilmiştir.

R. circumflexus sinister'in literatürlere (Bhargava ve Beaver, 1970; Karadağ ve Soygüder, 1989; Tecirlioğlu ve ark., 1977; Tıprıdamaz ve ark. 1977) uygun olarak a. coronaria sinistra'dan ayrıldığı gözlenmiştir. 11 kalpte r. circumflexus sinister'in r.

intermedius atrii sinistri'yi verdiği, iki kalpte r. intermedius atrii sinistri'nin bulunmadığı, bir kalpte ise bu damarın doğrudan a. coronaria sinistra'dan ayrıldığı tespit edilmiştir. 11 kalpte elde edilen veri, literatürler (Dursun, 1979; Karadağ ve Soygüder, 1989; Tecirlioğlu ve ark., 1977; Tıprıdamaz ve ark. 1977) ile paralellik gösterirken, bir ve iki kalpte elde edilen bulgular ile ilgili literatür bilgiye rastlanılmamıştır.

R. proximalis ventriculi sinistri'nin, r. circumflexus sinister'in orijininden sonra r. circumflexus sinister'in ventral duvarından (Karadağ ve Soygüder, 1989) orijinlenebileceği gibi, r. circumflexus sinister ile r. interventricularis paraconalis arasındaki açıdan ya da r. marginis ventricularis sinistri yakınından (Tecirlioğlu ve ark., 1977; Dursun, 1979) da çıkabileceği bildirilmektedir. Yapılan çalışmada, r. proximalis ventriculi sinistri'nin 11 kalpte r. circumflexus sinister'den, bir kalpte, r. circumflexus sinister ile r. interventricularis paraconalis sinistri'nin arasındaki açıdan, ayrıca literatür bildirimlerden farklı olarak iki olguda r. marginis ventricularis sinistri ile birlikte r. circumflexus sinister'den orijinlendiği tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmada, r. interventricularis subsinuosus'un r. circumflexus sinister'in devamı niteliğinde olduğu belirlenmiştir. R. interventricularis subsinuosus'un, evcil hayvanlarda (Dursun, 1979; Karadağ ve Soygüder, 1989; Müller ve ark., 1964; Schummer ve ark. 1981; Tıprıdamaz, 1987) r. circumflexus sinister'in devamı şeklinde olduğu ve sulcus interventricularis subsinuosus'un içinde veya yanında seyrettiği ifade edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bu bulgular ve literatür verileri ile uyumludur. Schummer ve ark. (1981)'nin bildirimlerine paralel olarak r. interventricularis subsinuosus'un sulcus interventricularis subsinuosus'a girmeden hemen önce r. ventriculi dextri'yi verdiği gözlenmiştir.

Sonuç olarak, yerel bir ırk olan Kıvırcık koyununun koroner damarlarının makroanatomik özelliklerinin belirlendiği bu çalışmanın, daha sonra

yapılacak olan klinik ve anatomik çalışmalara ışık tutabileceği kanısına varılmıştır. Koyun kalbinin, insan kalbine benzer anatomik özelliklerinden dolayı (Boumzebra ve ark., 2006) insan hekimliğinde yapılacak çalışmalara da model oluşturabileceği muhtemeldir.

KAYNAKLAR

- Akçapınar H., 2000. Koyun Yetistirciliği. İsmat Matbaacılık, Ankara.
- Aksoy G., Karadağ, H., 2002. Evcil kedi ve Beyaz Yeni Zelanda tavşanlarında kalp ve kalp arteriaları üzerinde anatomik bir çalışma. Vet. Bil. Derg., 18, 1-2: 33-40.
- Aycan K., Bilge A., 1984. Plaslik enjeksiyon ve korrozyon metodu ile vasküler sistem anatomisinin araştırılması. Erciyes Ü. Tıp Fak. Derg., 6, 545-552.
- Bhargava I., Beaver C., 1970. Observations on the arterial supply and venous drainage of the bovine hearth. Anat. Anz. Bd., 126, 343-354.
- Boumzebra D., Solem JO., Nakeeb S., Al halees Z., 2006. The sheep as a model for coronary artery surgery experimentation beating heart. The Journal of Tehran Heart Center., 11-15.
- Bull ML., Martins MRFB., 2002. Study of the arterial coronary circulation in the dog (Canis familiaris). Rev. Chil. Anat., 20, 117-123.
- Chakravarthy YS., Sastry AP., 1979. A note on the morphology of goat's heart and its coronary arterial circulation. Indian J. Anim. Sci., 49, 6485-487.
- Dursun N., 1978. Bir manda kalbinde gözlenen tek koroner arter olayı ve atipik vaskülarizasyonu. A. Ü. Vet. Fak. Derg., 25, 135-143.
- Dursun N., 1979. Köpeğin kalp arteriaları üzerinde anatomik araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 26, 18-19.
- Dursun N., 1981. Veteriner Komparatif Anatomi Dolasım Sistemi (Angiologia). A.Ü. Vet. Fak. Yayınları, Ankara.
- Dursun N., Türkmenoğlu İ., 1996. Kangal köpeklerinde septum interventricularinin arteriel vaskularizasyonu. Vet. Bil. Derg. 12, 141-144.

- Dursun N., Yıldız D., ve Kabak M., 1996. Yeni Zelanda tavsanında (*Oryctolagus Cuniculus L.*) septum interventriculare'nin arteriel vaskularizasyonu. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 43, 391–395.
- Karadağ H. ve Soygüder Z., 1989. Doğu Anadolu Kırmızısı sığırında kalp ve kalp arteriaları üzerinde anatomik bir çalışma. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 36, 482–495.
- Müller ME., Christensen GC., Evans HE., 1964. Anatomy of the Dog. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Nomina Anatomica Veterinaria, 2005. Nomina Anatomica Veterinaria. 4th ed. Zurich and Ithaca New York. New York International Committees on Veterinary Anatomical Nomenclature.
- Schummer A., Wilkens H, Vollmerhaus B., Habermehl KH., 1981. The Circulatory System, the Skin and the Cutaneous Organs of the Domestic Mammals. Verlag Paul Parey, Berlin Hamburg.
- Tecirlioğlu S, Dursun N., Uçar Y., 1977. Mandada kalp ve kalp arteriaları üzerinde anatomik araştırmalar. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 24, 361–374.
- Tıpırdamaz S. 1987. Akkaraman koyunları ve Kıl keçilerinde kalp ve kalp arteiaları üzerinde karşılaştırmalı çalışmalar. Selçuk Üni. Vet. Fak. Derg., 3, 179–191.
- Tıpırdamaz S., Dursun N., Yalçın H., 1996. Kangal köpeklerinde kalbin koroner arterleri üzerinde makroanatomik çalışmalar. Vet. Bil. Derg., 12, 2, 115–120.
- Türkmenoğlu İ., 1996. Köpekte ramus conii arteriosinin farklı orijini numunesi. Vet. Bil. Derg., 12, 2, 121–123.



Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması*

Hurrem Turan AKKOYUN^{1✉}, Nursel DOSTBİL²

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.
2. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Van.

Özet: Bu çalışmada Na-tellurit bileşiğinin toprak bakterilerinden alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarında inhibitör etkisi araştırıldı. Bakteriler, Na-tellurit bileşiğine karşı 1-180 µg/ml artan konsantrasyonlarda denendi. Na-tellurit bileşiğinin 1-60 µg/ml konsantrasyonlardaki denemesinde izolatların çoğunluğunun ürediği gözlemlendi. 70-180 µg/ml olarak denenen konsantrasyonlarda ise hassasiyet profilinin arttığı saptandı. 180 µg/ml konsantrasyonlarda ise % 100 hassasiyet gözlemlendi. Ayrıca, izolatlar için MICs değeri 0.8 µg/ml olarak belirlendi. İzolatların Na-tellurit bileşiğine karşı plasmid kodlu dirençliliğinin saptanması için acridine orange (20 µg/ml) ve ethidium bromid (10^{-5} M) ile plasmid eliminasyonu yapıldı. İzolatlar'da *Bacillus spp.*'ye ait % 60.86 Na-tellurit bileşiğine hassasiyet, % 39.13 dirençlilik fenomeni ve % 21.10 oranında da plasmid kodlu Na-tellurit dirençliliği bulundu. Na-tellurit bileşiğine ve antibiyotiğe karşı dirençlilik genini taşıyan plasmidler (*B. cereus* T112-Na-Te^R), Na-tellurit bileşiğine ve antibiyotiğe hassasiyet gösteren suşa (*B. megaterium* DSM 32-Na-Te^S) protoplast transformasyonu yoluyla aktarıldı ve 10^8 transformant elde edildi. Agaroz jel elektroforez seperasyonu sonucunda plasmidin 22.514 bp moleküler ağırlığa sahip olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Alkalifilik *Bacillus spp.*, Na-tellurite, Plasmid, Protoplast transformasyonu.

Investigations upon the Likelihood of Transformation and Resistance of Na-Tellurite Originated Plasmide at the Soil Bacteria Isolated from Natural Environment

Absrtact: In this study, the inhibitory effects of Na-tellurit compound at the Alkalophilic *Bacillus spp.* strains isolated from the soil bacteria were investigated. Bacteria were tested against the increasing concentrations of Na-tellurite at 1-180 µg/ml. The isolates of Na-tellurite at the 1-60 µg/ml concentrations mostly showed resistance, but sensitivity was determined at 70-180 µg/ml. Complete (100 %) sensitivity was observed at 180 µg/ml. For *Bacillus spp.*, the MICs of Na-tellurit were found to be 0.8 µg. Plasmid elimination was made using acridine orange (20 µg/ml) and ethidium bromide (10^{-5} M) for determination of the isolate resistance originated from plasmid against Na-tellurite. In the isolates of *Bacillus spp.*, there were 60.86 % sensitivity, 39.13 % resistance phenomenon and 21.10 % ratio of resistance originated from plasmid against Na-tellurite. Plasmids of *B. cereus* T112-Na-Te^R, carrying the resistance gene against the antibiotic and Na-tellurite, were transferred by protoplast transformation to *B. megaterium* DSM 32-Na-Te^S strain showing sensitivity against antibiotic and Na-tellurit. A number of 10^8 transformants from the soil isolates were obtained by protoplast transformation. The seperation of plasmid was made by agarous gel electrophoresis and, finally it was determined that the plasmid had 22,514 bp of molecular weight.

Key words: Alkalophilic *Bacillus spp.*, Na-tellurite, Plasmide, Protoplast transformation.

✉ Hurrem Turan AKKOYUN

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, e-posta: takkoyun@hotmail.com

*Bu çalışma Hurrem Turan AKKOYUN'ın "Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans Tezinin bir kısmından özetlenmiştir.

GİRİŞ

Günümüzde kimyasal maddeler ve beraberinde getirdiği olumsuz etkileri sağlığı tehdit edici boyutlara kadar ulaşmıştır. Toksik etkiye sahip olan kimyasal maddelerle ve çevre kirliliğinin daha üst boyutlara kadar ulaşması, ekolojik anlamda denge unsurunun ortadan kalkması ile birlikte birbirine zincirleme bağlı olan biyotik ve abiyotik faktörlerin bozulması anlamına gelmektedir.

Tellurium bileşiğinin mikroorganizmaların yaşam periyodu için mutlak gerekli bir besin kaynağı olmadığı ancak kısmen de olsa, kimyevi atık maddelerin bulunduğu ortamlarda kirlilik oluşturduğu bilinmektedir. Nadirde olsa organizmalar için toksik bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Berks ve ark., 1994; Taylor, 1996). Klinik bulgulara göre toksisitenin çok düşük konsantrasyonda bile meydana geldiği gözlenmiştir (Jobling ve Ritchie, 1987). Tellurit ve bileşiklerine karşı gerek kromozomal, gerekse ekstra kromozomal dirençliliğin moleküler mekanizması bilinmemektedir. Ancak Gram negatif bakterilerde Gram pozitif bakterilere göre tellurit dirençliliğinin daha sık olduğu gözlenmiştir (Summers ve Jacoby, 1977; Lloyd-Jones ve ark., 1994; Suzina ve ark., 1995; Turner ve ark., 1995). Yapılan bir çalışmada, Tellurium bileşiğinin elektrolitik indirgenme sonucu elde edildiğini ve $\text{Na}_2\text{TeO}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Te} + 2\text{NaOH} + \text{O}_2$ şeklinde formüle edildiğini vurgulamışlardır. Obligat aerobik fotosentetik bakteriler üzerinde yapılan bir çalışmada ise bakteri suşlarının tellurite direnç gösterdiklerini ve metalik tellurium kristallerini de biriktirdikleri gözlenmiştir (Yurkov ve ark., 1996). Romero ve ark., (1998) yaptıkları bir çalışmada potansiyel olarak çevresel atıkların bulunduğu ortamlarda toksisite gösteren potasyum tellurit bileşiğine karşı direnç sağlanması, *Pseudomonas sp.* suşlarının genetik manipulasyonları sırasında plasmidlerin vektör olarak kullanımı için, selektif bir marker özelliğinde olan ve önemli bir görev yapan genlerin var olduğuna işaret etmişlerdir. Taylor (1999), yaptığı bir çalışmada *E. coli* suşları için Na-tellurit bileşiğinin

yaklaşık MIC değerinin 1 µg/ml olduğunu belirtmiştir. İzolatların tellurite dirençliliklerinin kaydedilerek daha yüksek konsantrasyonlardaki denemelerinin devam ettiğini vurgulamıştır. Mikroorganizmalarda tellurium bileşiğine karşı dirençli suşlar araştırılırken hem kromozomal DNA'ya hem de ekstra-kromozomal DNA'ya bağlı dirençlilik geni taşıyan *E. coli* suşu tanımlamıştır. Bu olayda integral membran proteinlerinin de rol oynadığını gözlemişlerdir. Tellurit bileşiğinin bulunduğu ortamlarda, üreme davranışı gösteren bakteri hücrelerinde siyah renklenme gözükür. Bu hücre içi biriktirme olayı, metalik telluriumdeki telluritin indirgenmesinden kaynaklanmaktadır. Ancak mikroorganizmalarda bu şekilde meydana gelen biriktirme elektron mikroskopuyla tespit edilebilmektedir (Guzzo ve Dubow, 2000). Endüstriyel suşların manipulasyonu, üremesi ve diğer türlerde farklı kaynaklardan gelen genetik materyalin belirlenmesi mikrobiyoloji teknolojisinin günümüzde ve gelecekte gelişmesi için çalışılması gereken konuların başında gelmektedir.

Bu çalışmada rekombinant DNA teknolojileri arasında önemli yer tutan ve verim açısından ön planda olan transformasyon metoduyla yeni bakteriyel rekombinantların ve selektif marker özelliği taşıyan suşların üretimi amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Alkalifilik *B. spp.* suşlarının topraktan izolasyonlarında ve saf kültür olarak seçilmiş suşların stok kültürlerinin hazırlanmasında, Nutrient agar, LB agar, N1 besi yeri ve Medium 1 agar kullanılmıştır (Anonymous, 1978; Horikoshi ve Akiba, 1982; Gerhardt ve ark., 1994).

Sodyum tellurit dirençliliği gösteren *B. spp.* için bir dizi hareket, glukozdan gaz oluşumu, mannitolden gaz oluşumu, yüzey zarı oluşturma, uçucu indol oluşumu, voges-proskauer testi, simmons-sitrat testi, hemoliz testi, katalaz testi, lesitin hidrolizi testi, ürenin hidrolizi, jelatinin

hidrolizi, nişastanın hidrolizi, kazeinin hidrolizi, bir dizi karakteristik testler uygulanmıştır (Jin ve ark., 1990; Mc Faddin, 2000). Na-tellurit bileşiğinden öncelikle 25 mg/ml konsantrasyonda stok bir çözelti hazırlandı. Daha sonra 0.45 µm çaplı milipore filtreden geçirilerek steril edildi. Çalışmada Na-tellurit bileşiği maksimum 180 µg/ml konsantrasyonda kullanıldı ve sterilizasyondan sonra besi yerine eklendi. Çalışmada Na-tellurit bileşiğinin MICs değerinin araştırılması Turner ve ark., (1995)' na göre yapıldı. Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarından plasmid izolasyonu alkali lizi yöntemi ve ekstrakromozomal DNA moleküllerinin seperasyonu Maniatis ve ark., (1982)'na göre yapılmıştır. Çalışmada, protoplast transformasyonu metodu Sanders ve Nicholson (1987)' a göre yapılmıştır.

SONUÇ

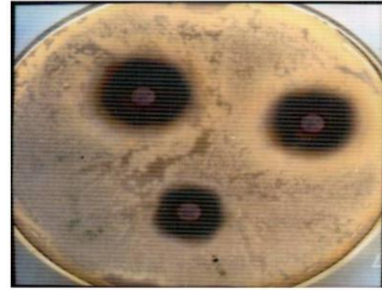
Toprakta İzole Edilen Alkalifilik *Bacillus spp.* Bakterilerine Ait Bulgular

Doğal ortamlardan alınan toprak örneklerinden toplam 787 alkalifilik *Bacillus spp.* suşu izole edilmiştir. 479 adet bakteri suşunun Na-tellurit bileşiğine % 60.86 oranında hassas olduğu tespit edilmiştir. Toplam 308 bakteri suşunun ise uygulanan Na-tellurit bileşiğine % 39.13 oranında dirençli olduğu gözlenmiştir. İzolatlar arasında ise toplam 65 suşun % 21.10 plasmid kodlu dirençlilik taşıdıkları test edilmiştir.

Çalışmada plasmid kökenli dirençlilik geni taşıyan test suşlarına 178 µg/ml konsantrasyonda denenen Na-tellurit bileşiğinden 30 µl Watmann: 1.6 mm çaplı kağıt disklere emdirilerek disk diffüzyon metodu uygulanmıştır. Uygulama sonucunda inhibisyon zonları gözlenmiştir (Şekil 1).

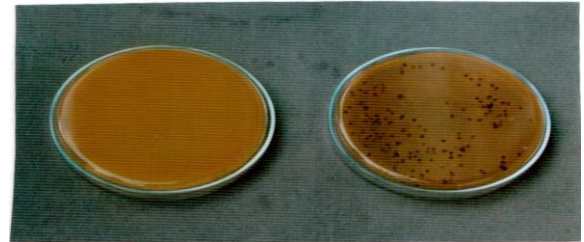
Protoplast transformasyon tekniği kullanılarak gerçekleştirilen transformasyon çalışmasında Na-tellurit bileşiğine plasmid kodlu dirençlilik geni taşıyan ve donör olarak seçilen *Bacillus cereus* T112 bakterisi kullanılmıştır.

Aynı şekilde Na-tellurit bileşiğine hassasiyet gösteren standart *B. megaterium* DSM 32 suşu alıcı olarak kullanılmıştır. Transformasyondan sonra resipient olarak kullanılan *Bacillus megaterium* DSM 32 suşunun Ethidium bromid ile muamele edilmesiyle Na-tellurit bileşiğine hassasiyet göstermiştir. Bu durumda transformantlardaki Na-tellurit dirençliliğinin plasmid kodlu olduğunu göstermektedir.



Şekil 1. Besi ortamında alkalifilik *Bacillus cereus* T112 ve *Bacillus spp.* suşlarının Na-tellurit bileşiğine bağlı olarak disk diffüzyon metodu ile gösterdiği inhibisyon zonları.

Figure 1. Depending on the strains of Na-Tellurite compound shown by the method of disc diffusion inhibition zones alkaliphilic *Bacillus cereus* and *Bacillus spp* in fattening T112.



Şekil 2. *Bacillus cereus* T112 suşunun protoplast transformasyon tekniğine göre gerçekleştirilmiş transformasyon bulguları.

Figure 2. Protoplast transformation technique carried out according to the transformation of *Bacillus cereus* strain T112 findings.

Elektroforez işleminde % 0.8'lik agaroz ve 5 V/cm akım uygulanmıştır. Jelde örnek yükleme slotlarına 25 µl DNA sükröz karışımı konmuştur. 1 numaralı sütunda EcoRI ve HindIII restriksiyon

enzimleriyle kesilmiş lamda DNA'sı bulunmaktadır. 2 numaralı sütunda alıcı suş: *Bacillus megaterium* DSM 32, 3 numaralı sütunda ise verici suş: *Bacillus cereus* T112 bulunmaktadır.



Şekil 3. Transformasyonda kullanılan verici ve transformant suşlara ait elektroforez bulguları.

Figure 3. Donor and transformant strains used in the transformation of the electrophoresis results.

Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarının Na-tellurit bileşiğine muamelesinde MICs değeri ve 0.8 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yapılan transformasyon çalışması sonucunda bakteride 8×10^6 transformant frekansı elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Günümüzde kimyasal maddeler ve beraberinde getirdiği olumsuz etkiler canlı sağlığını tehdit edici boyutlara ulaşmıştır. Toksik etkili kimyasal maddelerle ve çevre kirliliğinin daha üst boyutlara kadar varmış olması, ekolojik anlamda denge unsurunun ortadan kalkması ile birlikte birbirine zincirleme bağlı olan biyotik ve abiyotik faktörlerin bozulması anlamına gelmektedir.

Özellikle toprakta Gram (+) *Bacillus* cinsi bakteriler, toprağın doğal fauna grubunu oluşturması nedeniyle çevresel koşullardan en üst düzeyde etkilenen grup içerisine girmektedir. *B. steirotomophilus*, *B. Subtilis* ve *B. cereus* gibi bakteriler toprak bakterileri içerisinde sayılmaktadır (Robson ve Chambliss., 1984). *Bacillus spp.* suşlarının koloni yüzeylerinin görüntüsü genellikle çevresel faktörlerle değişir. Bu faktörler arasında en önemlileri kültürün bulunduğu besiyerinin bileşimi ve inkübasyon sıcaklığıdır. Çevresel faktörlerin değişmesi ile kültürün kendisinde de bir takım

değişiklikler olur. Yalnızca küçük koloni formlarını suşların dışında koloni çapı, besi yeri ve içerisindeki agar konsantrasyonuna bağlı olarak değişir (Lennete ve ark., 1985). Alkalifilik *Bacillus spp.* suşlarının izolasyonunda mukoid, kuru hareketli olduğu gözlenmiştir. Alınan toprak örneklerinin farklı yerlerden olması denemelerimizde alınan sonuçların farklı düzeylere çekmiştir. *S. faecalis* ve *Enterococcus* suşları arasında plasmid kodlu tellurit dirençliliği gözlenirken *S. faecium* türlerinde plasmid kodlu tellurit dirençliliği bulunamamıştır (Summers ve Jacoby, 1977).

Çalışmamızda *Bacillus* türlerinin bir kısmının plasmid kodlu dirençlilik geni taşıdığı bir kısmının ise taşımadığı gözlenmiştir. Ayrıca plasmid çalışmalarında bakteri hücrelerinden yüksek saflıkta alkalik ekstraksiyon yöntemiyle plasmid DNA'sının izolasyonu için bir prosedür geliştirmişlerdir (Marko ve ark., 1981). Çalışmada *Bacillus cereus* T112 suşundan alkali lizi yöntemiyle plasmid ekstraksiyonu yapılmıştır. *E. coli* suşları için sodyum tellurit bileşiğinin yaklaşık olarak MIC 1 µg/ml olduğu belirlenmiştir. İzolatların tellurite dirençlilikleri kaydedilerek (Taylor, 1999) daha yüksek konsantrasyonlardaki denemeler devam etmektedir. Ancak tellurit dirençliliği ile ilgili çalışmalarda bir çok mikroorganizmada dirençliliğin kromozomal DNA (Chiong ve ark., 1988; Chiong ve ark., 1988; Kinkle ve ark., 1994; O'Gara ve ark., 1997) ya da plasmid üzerinde olduğu vurgulanmıştır. Plasmid kodlu dirençlilik mikroorganizmalarda nadiren görülmektedir. Yaptığımız çalışmada izolatların MICs değeri Na-tellurit bileşiği için 0.8 µg/ml olarak hesaplanmıştır. Toplam *Bacillus sp.* suşlarının (% 21.10) Na-tellurit bileşiğine plasmid kodlu direnç geni taşıdığı gözlenmiştir. Dirençli izolatlar arasında bir kısmının plasmid kodlu dirençliliğin yanı sıra diğerlerinde kromozomal dirençlilik paralelinde olduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla yapılan çalışma, literatür bilgileri ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda 1-180 µg/ml arasındaki parametelerde Na-tellurit bileşiğinin kullanılması, literatüre göre birçok mikroorga-

nizma türü için oldukça toksik bir etkinin olduğu belirtilirken çalışmada kullanılan *Bacillus cereus* T112 yerel suşunun genetik açıdan farklı özellik taşıyan bir yapıda olduğu düşünülmektedir.

Bakterilere kromozomal ya da ekstra-kromozomal DNA'nın verilmesi, farklı genetik özelliği olan genlerin diğer mikroorganizmalara kazandırılması, bu mikroorganizmaların kimyasal yapısının daha kolay incelenmesine aracılık eder. Osmotik stabilitenin varlığında lizozim yardımıyla hücre duvarının parçalanıp bakteri hücresinden ayrılmasıyla protoplast elde edilebilir. Bu teknik sadece birbiri ile ilişkili olan türler arasında vaki olmadığı için rekombinasyon gerçekleşir. Ancak bu teknik aralarında ilişki olmayan türlerde uygulanmakta endüstriyel suşların geliştirilmesinde ve üretilmesinde çok büyük imkan sağlamaktadır (Gökhale ve ark., 1993).

Çalışmada transformasyon verimini arttırmak için rejenerasyon besi ortamlarında transforme bakterilerin tekrar üremesine olanak sağlanmıştır. Ancak bunun için % 16 sorbitol veya % 20 sükröz çözeltisi kullanılmıştır. Bu şekilde transformant bakterilerin yeni rekombinasyonu meydana getirdiği gözlenmiştir.

Tellurium bileşiğinin mikroorganizmaların yaşam periyodu için mutlak gerekli bir besin kaynağı olmadığı ancak relativ olarak kimyevi atık maddelerin bulunduğu ortamlarda kirlilik oluşturduğu bilinmektedir. Ekstrem olarak da organizmalar için toksik bir etkiye sahip olduğu vurgulanmıştır (Berks ve ark., 1994; Taylor, 1996). Klinik bulgulara göre toksisitenin çok düşük konsantrasyonda bile meydana geldiği gözlenmiştir (Jobling ve Ritchie., 1987).

Çalışmada Na-tellurit bileşiğinin konsantrasyonu yükseldikçe mikroorganizma üzerinde inhibitör etki artmıştır. Dolayısıyla 180 µg/ml Na-tellurit kullanılması denenen test suşlarının tamamının çoğalma davranışı göstermediği gözlenmiştir. Yapılan çalışmada protoplast transformasyon

metodunun kullanılmasının nedeni transformant veriminin diğer metotlara göre daha yüksek bulunmasına dayanmaktadır. Bu bağlamda, endüstriyel atıklarla veya toksisiteye sahip kimyasal maddelerle kirlenmiş çevrelerde Na-tellurit düşük konsantrasyonda bile bulunması mikroorganizmada akümülyasyon olayını meydana getirmektedir. Mutant hale gelmiş canlılar arasında spontan olarak transformasyon oluşabileceği gibi toprak faunasının ekolojik dengenin bozulması ile birlikte insan sağlığını da tehdit edici bir unsur olacaktır.

Sonuç olarak toprak bakterilerinin morfolojik, fizyolojik, kimyasal ve biyokimyasal testleri yapıldığında yabancı tip yapılarının dışında beklenmeyen sonuçların oluştuğu ve mutajen etkiye maruz kaldıkları düşünülmektedir. Kimyasal maddelerin etkileri incelendiğinde artan dozlarda toprağın yapısında normal fauna olarak kabul edilen bakterilerin yaşam frekansını düşürdükleri ve toprakta birikim oluşturdıkları gibi canlıların bu bağlamda yaşam şansını minimuma çekmektedir. Metal bileşikleriyle yapılan çalışmalar doğada biyotik faktörler üzerine hangi düzeylerde etki ettiği yönünde bir ipucu verecektir. Çalışma, rekombinasyon çalışmaları alanında özellikle plasmid DNA yapılarının transfer edilerek resipient organizmalarda aktivite göstermelerini başarmış olması nedeniyle bu konuda yapılacak çalışmalar için verimli bir kaynak olması düşünülmektedir. Bu bağlamda yapılan çalışmalara bir basamak oluşturacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Anonim, 1978. *Microbiyologisches Handbuch E.*, Merck Darmstad
- Berks BC., Ricardson DJ., Robinson C., Reilly A., Aplin RT., Ferguson SJ., 1994. Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *thiosphaera pantotropha eur.* J. Biochem., 220, 117-124.

- Chiong M., Bara R., Gonzales E., Vazquez C., 1988. Resistance of thermus sp. To potassium tellurite. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 610-612.
- Breadly DE., 1985. Detection of tellurite-resistance determinants in incp plasmid. *J. Gen. Microbiol.*, 131, 3135-3137.
- Gerhardt HC., 1994. The evolution of the vocalization in frogs and toads. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 25, 293-324.
- Gökhale DV., Puntambekar US., De Obagkart DN., 1993. Protoplast fusion, A tool intergeneric gene transfer in bacteria. *Biotech. Adv.*, 111, 1999-217.
- Guzzo J., Dubow MS., 2000. A novel selenite and tellurite inducible gene in Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 4972-4978.
- Horikoshi K., Akiba T., 1982. Alkalophilic Microorganisms. Japan Scientific Societies Press. Tokyo. pp. 213.
- Jin DI., Petters RM., Im KS., 1994. Transgenic Livestock – Review. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.*, 7, 1-17.
- Jobling MG., Ritchie DA., 1987. Genetic and physiological analysis of plasmid genes expressing inducible resistance of tellurite in escherichia coli. *Mol. Gen. Genet.*, 208, 288-293.
- Kinkle BK., Sadowski MJ., Johnstone K., Koskinen WC., 1994. Tellurium and selenium resistance in rhizobia and its potential use for direct isolation of rhizobium meliloti from soil. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1674-1677.
- Lloyd-Jones G., Osborn AM., Ritchie DA., Strike P., Hobman JL., Brown NL., Rouch DA., 1994. Accumulation and intracellular fate of tellurite in tellurite resistant e. coli, A model for the mechanism of resistance. *FEMS. Microbiol. Lett.*, 118, 113-120.
- Macfaddin JF., 2000. Hydrogen sulfide test. Chapter 15, Biochemical tests for identification of medical bacteria (3rd edition), Lippencott, Williams and Wilkins. Philadelphia, 205–220.
- Makro MA., Chipperfield R., Birnboim HC., 1982. A procedure for the large-scale isolation of highly plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. *Environ. Biochemistry*, 121, 182-187.
- Maniatis T., Fritsch EF., Sambrook J., 1982. Molecular cloning, cold spring harbor, New York, USA., 379.
- Ogara JP., Gomelsky M., Kaplan S., 1995. Identification and molecular genetic analysis of multiple loci contributing to high-level tellurite resistance, in rhodobacter sphaeroides 2.4.1. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 4713-4720.
- Robson LM., Chambliss GH., 1984. Characterization of the cellulolytic activity of bacillus isolate. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47, 1039-1046.
- Romero MS., Orejas RD., Lorenzo V., 1998. Resistance to tellurite as a selection marker for genetic manipulation of pseudomonas strains. *App. Environ. Microbiol.*, 64, 4040-4046.
- Sanders ME., Nicholson A., 1987. A method for genetic transformation of nonprotoplasted streptococcus lactis. *App. Environ. Microbiol.*, 1730-1736.
- Summers AO., Jacoby GA., 1977. Plasmid-determined resistance to tellurium compounds. *J. Bacteriol.*, 129, 276-281.
- Suzina NE., Duda VI., Anisimova LA., Dmitriev VV., Boronin AM., 1995. Cytological aspects of resistance to potassium tellurite conferred on pseudomonas cells by plasmids. *Arch. Microbiol.*, 163, 282-285.
- Taylor DE., Summers AO., 1979. Association of tellurium resistance and bacteriophage inhibition conferred by R plasmids. *J. Bacteriol.*, 137, 1430-1433.
- Taylor A., 1996. Biochemistry of tellurium biology. *Trace Elementary Residual.*, 55, 231-239.
- Taylor DE., 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiology*, 7, 111-115.
- Turner RJ., Weiner JH., Taylor DE., 1995. The tellurite resistance determinants tehatehb and klaaklabtelb have different biochemical requirements. *Microbiology*, 141, 3133-3140.
- Yurkov V., Jappe J., Vermeglio A., 1996. Tellurite resistance and reduction by obligately aerobic photosynthetic bacteria. *Appl. Environ. Microbiology.*, 62, 4195-4198.



Hiperisin'in İzole Edilmiş Sıçan Midesinde Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi*

Ahmet TOPAL[✉], Fikret ÇELEBİ

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum.

Özet: *Hypericum perforatum* total ekstraktının antiinflamatuar, antidepresan, antiülserojenik gibi biyolojik etkiye sahip olduğu ve mide hareketlerini ve mide asit salgısını azalttığı rapor edilmiştir. *Hypericum perforatum*'dan ekstrakte edilen ve doğal bir pigment olan hiperisin'in de antidepresan bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bunlarla birlikte, mide asit salgısı üzerine *Hypericum perforatum*'u oluşturan bileşenlerden hangisinin etkili olduğu tam aydınlatılamamıştır. Sunulan çalışmada, *Hypericum perforatum*'un bir bileşeni olan hiperisinin sıçan midesinde, *in vitro* mide asit sekresyonu üzerine etkisi araştırılmıştır. İzole organ banyosunda gerçekleştirilen deneylerde histamin, betanechol ve pentagastrin ile ayrı ayrı uyarılmış mide asit salgısı üzerine hiperisinin dört farklı dozunun (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) etkileri incelendi. Bazal pH elde edildikten sonra, hiperisinin mide asit salgısında meydana getirdiği değişikliklere göre Δ pH değerleri belirlendi. Elde edilen sonuçlar, farklı hiperisin dozlarının histamin, bethanechol ve pentagastrin ile uyarılan mide asit sekresyonunu etkilemediğini gösterdi ($p>0.05$). Sonuç olarak, hiperisinin sıçan midesinde *in vitro* asit sekresyonu üzerinde herhangi bir etkisi görülmedi.

Anahtar kelimeler: Hiperisin, Mide Asit Sekresyonu, Sıçan.

Effects of Hypericin on Gastric Acid Secretion in Isolated Rat Stomach

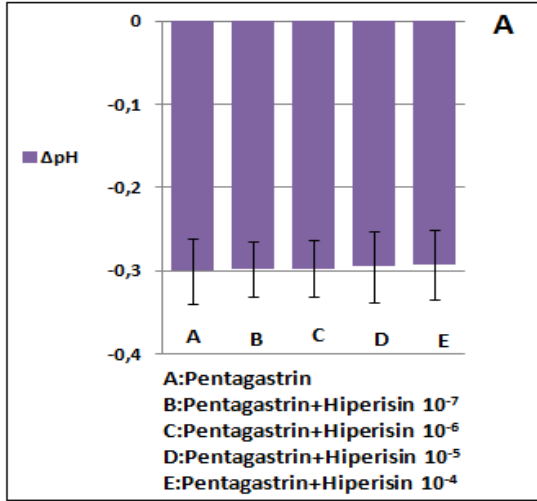
Abstract: It has been reported that the total extract of *Hypericum perforatum* has biological effect such as antiinflammatory, antidepressant, antiulcerogenic and it has reduced the stomach movements and gastric acid secretion. It is known that hypericin, the natural pigment, which is extracted from Kantaron, has an antidepressant effect. However, it has not been just clarified that which component composed *Hypericum perforatum* is effective on gastric acid secretion. In the present study, the effect of hypericin, one of the components of *Hypericum perforatum*, on gastric acid secretion were investigated *in vitro* in the stomach isolated from rats. The effects of four different doses (10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M) of hypericin were investigated on gastric acid secretion stimulated by histamine, bethanechol and pentagastrin. After basal pH was obtained, Δ pH value was determined according to the changes in gastric acid secretion caused by hypericin. The results showed that different hypericin doses did not affect gastric acid secretion stimulated by histamine, bethanechol, pentagastrin ($p>0.05$). As consequence, there was no effect of hypericin on *in vitro* acid secretion in isolated rat stomach.

Key words: Hypericin, Gastric Acid Secretion, Rat.

[✉]Ahmet TOPAL

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, e-posta: drahmertopal@hotmail.com

*Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. 2011, 6 (3) 201-208'de yayınlanan aynı başlıklı makalenin sayfa 206'daki şekil 4 A grafiği baskı aşamasında yapılan bir hata nedeniyle gösterilmemiştir. Makalenin özeti ve eklenen şekil 4A ve B bu sayıda yeniden yayınlanmıştır.



Şekil 4A. İzole edilmiş sıçan midesinde famotidine ve atropine varlığında pentagastrin ile uyarılmış gastrik asit sekresyonu üzerine hiperisin'in etkisi (n=4, ort±SEM, P>0.05). **B.** İzole edilmiş sıçan midesinde famotidine, proglumide ve atropine varlığında pentagastrin ile uyarılmış gastrik asit sekresyonu üzerine hiperisin'in etkisi (n=4, ort±SEM, P>0.05).

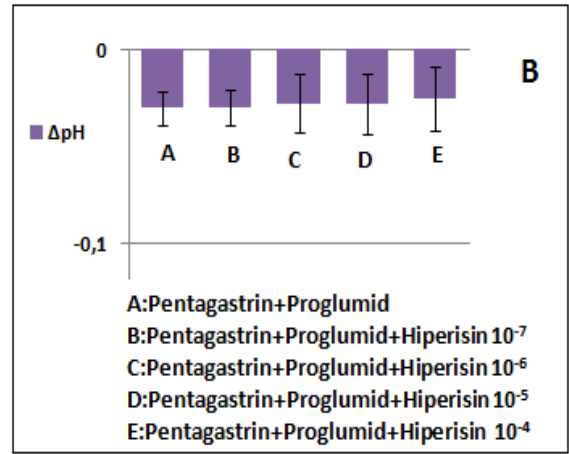


Figure 4A. Effect of hypericin on pentagastrin-induced acid secretion in isolated rat stomach in the presence famotidine and atropine (n=4, mean±SEM, P>0.05). **B.** Effect of hypericin on pentagastrin-induced acid secretion in isolated rat stomach in the presence famotidine, proglumide and atropine (n=4, mean±SEM, P>0.05).



Bir Koyunda Sekonder Abdominal Gebelik

Hayrettin ÇETİN^{1✉}, Ömer KORKMAZ², Mehmet Osman ATLI³

1. Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Aydın.
2. Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Şanlıurfa.
3. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji ABD, Diyarbakır.

Özet: Uterus dışında gözlenen gebelikler 'ektopik gebelik' olarak sınıflandırılır. Bu olgu sunumunda, bir koyunda sekonder abdominal gebelik olgusunun sunulması amaçlandı. Olguyu, doğumun gecikmesi şikayeti ile Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji kliniğine getirilen 4 yaşlı İvesi ırkı bir koyun oluşturdu. Klinik ve ultrasonografi muayeneleri sonucunda gebe olduğu anlaşılan koyuna laparo-histeretomi yapıldı. Laparo-histeretomi esnasında ölü yavrunun karın boşluğunda mesenteriyum ile sarılı olduğu gözlemlendi. Ayrıca, uterusun tamamen involte olduğu gözlemlendi. Bununla beraber, uterus veya vajinada herhangi bir yırtık gözlemlenmedi. Elde edilen bu sonuçlara göre, olgu 'sekonder abdominal gebelik' olarak tanımlandı. Koyunlarda gebelik patolojilerinden biri olan sekonder abdominal gebeliğe kliniğimizde ilk defa rastlanılmaktadır. Sonuç olarak, koyunlarda uzayan gebelik olgularında, sekonder abdominal gebelik olasılığı her zaman göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Koyun, Sekonder abdominal gebelik.

Secondary Abdominal Pregnancy in an Ewe

Abstract: Pregnancies that occur out of the uterus are classified as 'ectopic pregnancy'. In this case report, the aim was to present 'secondary abdominal pregnancy' in an ewe. The case, a four years old Awassi ewe with a history of prolonged pregnancy, was referred to University of Harran, Faculty of Veterinary Medicine, Clinic of Obstetrics and Gynaecology. After the clinical and ultrasonographic examinations, the ewe was diagnosed as pregnant and then laparo-hysterotomy operation was applied. During the laparo-hysterotomy, a dead fetus was found in the abdominal cavity that was covered by mesenteric structure. An entirely involuted uterus was also observed. Furthermore, there were no tears on the uterus or vagina. According to these findings, the case was described as 'secondary abdominal pregnancy'. This was the first occasion of such case, as one of the pathologic conditions of pregnancy, in our clinic. As a result, in case of prolonged pregnancy, the likelihood of secondary abdominal pregnancy should be always considered in ewes.

Key words: Ewe, Secondary abdominal pregnancy.

GİRİŞ

Uterusun dışında görülen gebelikler, ektopik gebelik olarak isimlendirmektedir (Lozeau ve Potter 2005; Beers 2006). Ektopik gebelikler kendi içinde, tubal ve abdominal olmak üzere iki gruba ayrılır. Tubal gebelikte; fertilize oosit, oviduktaki göçü esnasında uterusu ulaşmadan ovidukt içinde kalır (Corpa 2006; Sturlese ve ark. 2009). Abdominal gebelik ise kendi içinde iki alt gruba ayrılır. Primer abdominal gebelikte; oosit oviduktan karın boşluğuna geçmiş, orada fertilize olup gelişimini sürdürmekte veya ovidukt içinde fertilize olan ovum peritoneal boşluğa geçmiş ve mesenteriyum ve karın boşluğu zarları ile sarılmış olabilir (Corpa 2006). Sekonder abdominal gebelik ise fetüsün uterusu implantasyonundan sonra torsiyon uteri, fetal anfiyem, kronik perimetritis ve oksitosin enjeksiyonu sonrası uterusu oluşan yırtık sonucunda oluşmaktadır (Kılıçaslan 2005; Corpa 2006). Sekonder abdominal gebelikte; karın boşluğuna düşen fetüsün plasenta bağlantıları uterusu veya karın boşluğundaki çevresel dokulara yeniden implante olabilir. Bunların dışında karın boşluğuna düşen fetüsün karın içine plasental bağlanması şekillenmeyebilir (Corpa 2006). Günümüze kadar çiftlik hayvanlarda ektopik gebelik kısırakta (Freytag 1972; Thursby-Pelham 1992), inekte (Botcherby 1980; Hedge 1989), tavşanda (Segura ve ark. 2004) ve koyunda (Davies 1980; Madani ve Targari 1984; Mitchell 1989) rapor edilmiştir.

Bu gözlemden, kliniğimizde karşılaşılan bir koyundaki sekonder abdominal gebeliğin bildirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın materyalini Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Ana Bilim Dalı Kliniğine doğumun geciktiği şüphesi ile getirilen 4 yaşlı İvesi ırkı koyun oluşturdu. Alınan anamnezde 5 gün önce doğum sancılarının görüldüğü ve vulvadan yavru sularının boşaldığı öğrenildi.

SONUÇ

Koyunun; abdominal palpasyonda fetüsa ait oluşumların hissedilmesi ve transabdominal ultrasonografik muayenede ise fetüsün görülmesi ile gebe olduğuna karar verildi. Transvaginal olarak elle yapılan klinik muayenede serviks kapalı olduğunun tespit edilmesi, anamnez ve klinik muayeneler sonucunda yavrunun laparo-histeretomi operasyonu ile alınması kararlaştırıldı. Laparo-histeretomi esnasında karın boşluğunda fetal gelişimini tamamlamış, ölü bir yavru görüldü (Şekil 1, 2). Yavru mesenteriyum ile sarılıydı ve karın boşluğunda mekonyum ve plasental yapıların olduğu (Şekil 3) görüldü. Ayrıca uterus tamamen involüe olmuş idi (Şekil 4).



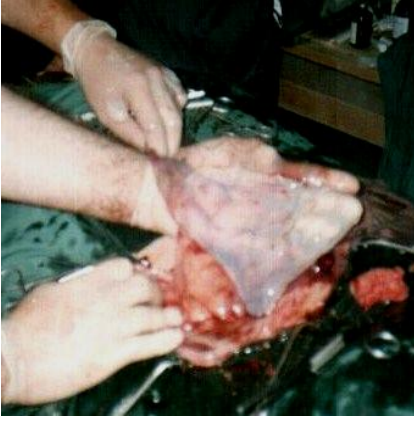
Şekil 1. Uterus ve karın boşluğunda yavru.

Figure 1. Uterus and fetus in abdominal cavity.



Şekil 2. Karın boşluğunda yavru.

Figure 2. Fetus in abdominal cavity.



Şekil 3. Karın boşluğunda plasental yapılar.
Figure 3. Placenta in abdominal cavity.

Ölü yavru mesenteriyumdan ayrıldı ve bölgeden uzaklaştırıldı. Karın boşluğu serum fizyolojik ile temizlendi. Bu olaya, uterusda doğum sancılarının yol açabileceği herhangi bir yırtık ya da deliğin yol açtığından şüphelenildi. Ancak, uterusun inspeksiyon ile yapılan muayenesi sonucunda herhangi bir delik ve yırtığa rastlanılmadı. Vaginoskop yardımıyla yapılan inspeksiyon sonucunda vagina duvarında da herhangi bir delik ya da yırtık tespit edilemedi. Karşılaşılan bu olgunun uterusda veya vaginada herhangi bir yırtık gözlemlenmemesine rağmen sekonder abdominal gebelik olduğu kanısına varıldı.

TARTIŞMA

Bu vakada, bir koyunda rastlanan sekonder abdominal gebelik ve muhtemel sebepleri sunuldu. Ülkemizde yapılan klinik retrospektif çalışmaların (Erk ve Akkayan 1970; Kaymaz ve ark. 2004; Sekin ve ark. 2005) hiçbirinde ektopik gebelik bildirilmemiştir. Benzer şekilde post mortem olarak 1408 dişi koyunun postpartum genital organlarının detaylı incelenmesinde gebelik patolojisi olarak tubal veya abdominal gebelik belirlenmemiştir (Çetin ve ark. 2006). Hayvanlarda ektopik gebeliğin insanlara nazaran çok az görülmesinin sebebi, insanlar için özellikle ektopik gebeliklerin şekillenmesinde önemli nedenler arasında gösterilen kontraseptif uygulamalar, sigara, jinekolojik cerrahi operasyonlar gibi



Şekil 4. İnvole olmuş uterus.
Figure 4. Involved uterus.

bazı risk faktörlerin hayvanlar için söz konusu olmaması düşünülebilir.

Sunulan olguda sekonder abdominal gebelik teşhisi laparo-histeretomi esnasında konulmuştur. Operasyon esnasında görülen mekonyum ve yavruda herhangi bir kokuşma ya da bozulmanın olmaması yavru canlılığının bir süre devam ettiği kanaatini uyandırmaktadır. Koyunlarda involüsyon sürecinin hızlı olması (Öcal 2005) sunulan vakada involüsyonun morfolojik olarak tamamlanmasına yetecek süre önce doğumun başladığı ama uterusda oluşan herhangi bir yırtık sebebiyle yavrunun karın boşluğuna geçtiği ve bu sürede yırtığın kapandığı veya fark edilmeyecek bir hal aldığı şüphesi uyanmıştır. Ayrıca bu durum miyometriumun çok az veya hiç skar dokusu geride bırakmadan rejenerasyon kabiliyeti ile de örtüşmektedir (Corpa 2006). Özellikle koyunlarda serviksin açılmamasına bağlı güç doğumlar (ringwomb) oldukça sıklıkla gözlenmektedir (Haughey 1983). Sunulan olguda uterustaki yırtık oluşumunun bir nedeni de serviksin açılmaması olabilir. Anamneze ilişkin olarak herhangi bir uterotonik preparatın kullanılmamış olması bu şüpheyi artırmaktadır.

Sonuç olarak, doğumu gecikmiş olgularda doğum kanalında yavrunun bulunamaması durumunda sekonder abdominal gebelik ihtimali de gözden uzak tutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

- Beers MH., 2006. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy. MERCK and CO INC, Whitehouse Station, NJ.
- Botcherby WC., 1980. Ectopic pregnancy in a cow. Vet. Rec., 106, 565-566.
- Corpa JM., 2006. Ectopic pregnancy in animals and humans. Reproduction., 131, 631-640.
- Çetin H., Hatipoğlu F., Korkmaz Ö., Atlı MO., 2005. Şanlıurfa yöresindeki koyunlarda gebelik ve genital organ bozukluklarının postmortem değerlendirilmesi. Veterinarium., 16, 36-44.
- Davies PT., 1982. Extrauterine pregnancy in a ewe. Vet. Rec., 110, 475.
- Erk H., Akkayan C., 1970. 1952-1969 yılları arasında kliniğimize getirilen hayvanların doğum ve jinekolojik hastalıklarının genel analizi. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg., 17, 500-517.
- Freytag K., 1972. Secondary abdominal pregnancy in a mare. Dtsch. Tierarztl. Wschr., 79, 522-524.
- Haughey KG., 1986. Dystocia. In Morrow DA ed, Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia. WB. Saunders Company.
- Hedge D., 1989. Extrauterine fetal development. JAVMA., 194, 1522.
- Kaymaz M., Yağcı İP., Macun HC., 2004. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji kliniğine 1987-2001 yılları arasında getirilen hayvanların genel analizi. Erciyes Üniv. Vet. Fak. Derg., 1, 35-41.
- Kılıçaslan MR., 2005. Gebelik Patolojisi. in: Alaçam E (ed) Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Lozeau AM., Potter B., 2005. Diagnosis and management of ectopic pregnancy. Am. Fam. Physician., 72, 1707-1714.
- Madani BO., Tırgari M., 1984. Extrauterine pregnancy in a ewe. Vet. Rec., 115, 547-548.
- Mitchell KW., 1989. Ectopic pregnancy in a ewe. Vet. Rec., 124, 498.
- Öcal H., 2005. Puerperal Dönem ve Sorunları. in: Alaçam E. (ed) Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Medisan Yayınevi, Ankara.
- Segura GP., Peris PB., Martinez MJ, Ortego PJ., Corpa AJM., 2004. Abdominal pregnancies in farm rabbits. Theriogenology., 62, 642-651.
- Sekin S., Özyurtlu N., İçen H., Taşdemir S., Kanay BE., 2005. Mayıs 2003 mayıs 2005 yılları arasında Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nde muayene edilen hayvanların genel analizi. Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg., 11, 133-136.
- Sturlese E., Retto G., Palmara V., De Dominici R., Lo Re C., Santoro G., 2009. Ectopic pregnancy in tubal remnant stump after ipsilateral adnexectomy for cystic teratoma. Arch. Gynecol. Obstet., 280, 1015-1017.
- Thursby-Pelham RH., 1992. Mare sacanning possible ectopic pregnancy. Vet. Rec., 130, 500.



Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları

Ahmet Kürşat AZKUR[✉], Muhammet Eren ASLAN

Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji AD, Kırıkkale.

Özet: Akış sitometri hücrelerin fenotipik ve karakteristik özelliklerini kalitatif ve kantitatif olarak inceleyen bir cihazdır. Bu cihaz ile, hücrenin yüzey ve iç proteinleri, organelleri ve diğer bileşenleri analiz ve ayrımı, lazer ve elektronik teknolojisi kullanılarak büyüklük, granülarite ve floresans emisyonu esasına göre gerçekleştirilmektedir. Kısa bir süre içinde heterojen bir popülasyonda analiz yapma ve yüksek saflıkta hücre ayırma yeteneğine sahip olan güçlü bir araçtır. Akış sitometri beşeri hekimlikte hematoloji, immünoloji ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra immünoloji laboratuvarlarının vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Akış sitometri, son yıllarda geniş kullanım alanı ile veteriner hekimlik içinde önemli bir araştırma ve klinik teşhis aracı haline gelmiştir. Veteriner hekimlerin klinik saha çalışmalarında akış sitometri cihazlarını kullanmaları sayesinde, hayvan ve insan refahını olumsuz etkileyen birçok persiste ve/veya klinik enfeksiyonun tespiti ve tedavisi çok kısa sürede, kolaylıkla yapılabilecektir. Veteriner hekimlikte akış sitometri kullanımının yaygınlığının sağlanması kullanılan ayıraç maddelerin azlığının giderilip, daha fazla sayıda monoklonal antikorun ticari olarak elde edilebilir ve kullanılabilir hale getirilmesi ile mümkündür. Bu rapor ile akış sitometrinin genel prensipleri, avantajları ve veteriner hekimlikte kullanılan uygulamaları derlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Akış sitometri, Hücre analizi, Klinik kullanım, Veteriner hekimlik.

Flow Cytometry and its Applications for Veterinary Medicine

Abstract: Flow cytometry is a device for qualitative and quantitative analyses of the phenotype and characteristics of cells. The outer and inner cellular proteins, organelles and other components analyses and their separations are based on the size, granularity and fluorescence emission detection using laser and electronic technology. Making analysis in heterogeneous population in a short time and is a powerful tool that is capable of high-purity separation of cells. Flow cytometry is used widely in hematology, immunology, and clinical practice of human medicine and it has been an indispensable part of the immunology laboratory. In recent years, flow cytometry has become a valuable clinical diagnostic tool with a wide field of use in veterinary medicine. Detection and treatment of persistent and/or clinical infections having adverse effects on animal and human well-beings would easily be made using flow cytometry in clinical field studies performed by veterinarians in the near future. The prevalence of veterinary use of flow cytometry, is available with the separator material and more commercially monoclonal antibody. With this report, the general principles of flow cytometry, advantages and applications that are used in veterinary medicine has been reviewed.

Key words: Flow cytometry, Cell analysis, Clinical use, Veterinary medicine.

GİRİŞ

İlk çağlardan bu yana insanoğlu, bilinmeyeni keşfetme arzusu ile bilim ve teknoloji alanında hiç durmadan araştırma yapmaktadır. Yapılan çalışmalar günümüze ışık tutmuş ve bilim insanlarını yönlendirerek sorunların çözümü noktasında daha detaylı düşüncelerini sağlamıştır. Böylece, insanlık için önemli birçok sorun araştırılmakta ve çözümler üretilmeye çalışılmaktadır. Bunun paralelinde gelişen bilim ve teknoloji sayesinde birçok, alet, cihaz ve teknik geliştirilmiştir. Özellikle bilgisayarın icadı ve gelişmesi ile moleküler tekniklerin, biyoloji ile birleşmesi sonucu bilim insanlarının en kısa sürede, en doğru sonuca ulaşmalarını sağlamaya başlamıştır.

Akış (Flow) sitometri cihazı ve kullanılan sarf malzemelerin dünya pazarındaki satış hacmi, 2008 yılı itibarıyla 1.5 milyar dolar olduğu ve dünyada yaklaşık yedi bin adet akış sitometri cihazı bulunduğu rapor edilmiştir (Flow Cytometry Report, 2008). Bunun yanında yapılan bilimsel çalışmalara ait ilk makaleler, 1975 yılı sonrasında yayınlanmaya başlanmıştır. 2008-2009 yılları itibarı ile ulusal ve uluslararası dergilerde, akış sitometri tekniğinin kullanıldığı yayın sayısının 11.000 civarında olduğu tespit edilmiştir. Buna rağmen ülkemizde ne yazık ki bu tür istatistiksel analizleri içeren bir çalışma ve hesaplama yapılmamıştır.

Akış sitometri, ilk olarak 1950'li yıllarda araştırma laboratuvarları için geliştirilen, 1980'lerin başında hekimlerin hastalarda yardımcı T hücrelerin düşüşü ile karakterize, o dönemin gizemli bir hastalığı olan HIV'in tespiti sonrasında klinik laboratuvarları için de vazgeçilmez hale gelen bir cihazdır (Shapiro, 2003). Akış sitometri birçok bilim dalında yaygın olarak kullanılmaktadır. Önceleri hematoloji laboratuvarlarında kullanılan bu cihaz ve sistem günümüzde başta hematoloji, immünoloji, onkoloji olmak üzere; viroloji, bakteriyoloji, mikoloji, organ nakil birimleri, araştırma laboratuvarları ile patoloji, histoloji, biyokimya gibi klinik laboratuvarla-

rında kullanılan önemli bir araştırma yöntemi olarak yerini almıştır. Klinik laboratuvarların yanı sıra gıda, toksikoloji, deniz bilimleri araştırmalarında da bu cihazdan oldukça sık yararlanılmaktadır (Herzenberg ve ark., 2002; Ibrahim ve ark., 2007; Kima ve ark., 2008; Kumaraguru ve ark., 2004). Örneğin herpes simpleks gibi viral kaynaklı immunopatolojik hastalıklarda *in vivo* olarak regülatör T hücrelerin rolünü belirlenmesi, NK inhibitör reseptörlerin etkileşimleri ve regülatör sistemin latent enfekte trigeminal gangliyonlarda koruyuculuğunun tespiti, shRNA veya yeşil flooresan proteinleri içeren plazmidlerin transfeksiyonda ki etkinliğinin belirlenmesi için kullanılmıştır (Azkur ve ark., 2005; Suvas ve ark., 2004; Suvas ve ark., 2006). Akış sitometri ile uygun antikor panelleri kullanılarak, hücre tipi (hematopoietik, lenfoid, veya nonhematopoietik) veya hücre türleri (B ve T hücreleri, doğal öldürücü hücreler, myeloid/monositik hücreler, neuro/neuroendokrin hücreler ve epitelyal hücreler) ile hücre olgunlaşması aşamasında öncül ve olgun hücrelerin tespiti yapılabilmektedir (Kima ve ark., 2008; Suvas ve ark., 2004; Youli ve ark., 2009). Bunun paralelinde alerjik hastalıklara neden olan etkenlerin ve bunların kontrolünde görevli mekanizmaların rolü akış sitometri cihazı ve tekniğini kullanarak başarılı bir şekilde tespit edilmiştir (Palomares ve ark., 2010).

Akış sitometri cihazı ile analiz için, hücre süspansiyonu hazırlamak amacıyla kan, kemik iliği, beyin, omurilik sıvısı, bronkoalveoler lavaj sıvısı, eklem sıvısı, plevral sıvı, doku biyopsi örnekleri, parafin bloktaki dokular ve hücre kültürü örnekleri kullanılabilir (Tablo 1) (Azkur ve ark., 2005; Peterson ve ark., 2008; Rose ve Knox, 2007).

İncelenen antijenlerin tespiti için; monoklonal antikorlar ve florokromlar teknolojisi ile fizik ve bilgisayar teknolojisinin birleştirilmesi sonucunda, akış sitometri cihazı keşfedilmiştir (Tablo 1) (Youli ve ark., 2009). Sitometri, hücrelerin veya biyolojik partiküllerin kantitatif olarak fiziksel ve/veya

biyokimyasal karakterlerinin ölçülmesidir. Kısaca akış sitometri, bir sıvı içerisinde (süspansiyon) hücre veya partiküllerin, kantitatif ve kalitatif özelliklerinin incelenmesi olarak tanımlanabilir (Rahman, 2006). Günümüzde bu işlem için "flow" veya "akış" sitometri terimleri kullanılmaktadır. Akış sitometri ile süspansiyon halinde bulunan hücre veya partiküller, lazer ışığı yansıtılan bir bölmeden geçirilir. Bu bölmeden tek tek geçen hücrelerin, lazer ışığı ile aydınlatılması sonrasında, üstünden yansıyan ışınlar ait sinyaller, uygun detektör ve filtreler tarafından tespit edilir, bu ışınlar toplanır ve analiz edilir (İbrahim ve Engh, 2007; Nunez, 2001). Oluşan bu sinyaller, hücrenin büyüklük, granülarite gibi fiziksel özelliklerine bağlı bilgileri verdiği gibi; hücre içi ve dışı reseptör ve yapılarına bağlanan çeşitli florokromlardan da kaynaklanabilir (Herzenberg ve ark., 2002). Böylece, akış sitometri ile yüksek duyarlılıkla, hücre yada partikülün immünofenotipi, DNA içeriği miktarı, enzim aktiviteleri, spesifik antikolar tarafından tanınan hücrenin; yüzeyi,

sitoplazması ve/veya çekirdeğinde bulunan anti-jen/markırların (belirteç) tespiti ve canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilmektedir. Bunun yanında alt tiplerine kadar hücre tespiti ve antijen sunan hücrelerin yüzeyinde bulunan epitoplara tespiti de kolaylıkla yapılabilmektedir (Dunphy, 2004; Suvas ve ark., 2006; Youli ve ark., 2009).

Akış sitometri cihazı ve tekniği son derece hızlıdır, çok kısa bir sürede binlerce hücreyi analiz ederek, detaylı sonuç raporları elde edilir. Heterojen bir örnek popülasyonunda, hücrelerin ve bileşenlerinin çok parametrelili kantitatif özellikleri çok kısa bir sürede analiz edilebilir (Tablo 1) (İbrahim ve Engh, 2007). Akış sitometri'nin en güçlü ve kendisine özgü avantajı, hücreleri fiziksel olarak birbirlerinden ayırt edebilmesidir. Böylece daha ileri analizler yapabilmek için, spesifik hücrelerin saf örneklerini elde etmek mümkün olur (Daniel, 2004). Bu tür çalışmalar son dönemde kök hücre ve gen terapi çalışmalarında kullanılmaktadır (Brown ve Wittwer, 2000).

Tablo 1. Akış sitometri cihazı ile analizin başlıca basamakları

Table 1. The main steps of the analysis with flow cytometry

Aşama	Yapılacak İşlemler
Analiz Öncesi	Deney modeli tasarımı Kan örneklerinin antikoagulanlı şekilde alınması, Diğer örneklerin uygun şekilde temini Taşıma ve saklama koşullarının gözden geçirilmesi Örneklerin uygunluğunun tespiti (pıhtılaşma, hemoliz durumu) Numunenin canlılığının tespiti (% ölü hücre tespiti) Örneklerin çalışılmak üzere hazırlanması
Analiz Sırasında	Cihazdaki lazerlerin kalibrasyonu; optik hizalama, optik filtrelerin kontrolü Elektronik aksamın kontrolü; detektör ve voltaj kontrolü Floresan boyaların akış sitometri cihazında kalibrasyonu Kontrol grubu materyallerin düzenlemesi; kontrol boncukları, biyolojik materyaller Antikor seçimi; deney modelindeki materyallerin spesifite, affinite ve antikor panel kombinasyonları belirlenmesi Tek veya çok parametrelili analiz Kapı alma işlemi İstenilen hücrelerin ayrımı ve toplanması (cell sorting), ölü hücrelerin dışlanması
Analiz Sonrası	Verilerin yorumlanması Verilerin raporlanması Klinikte kullanım Klinik sonuç

Akış sitometri cihazları hücrelerin veya bileşenlerinin ayrıntılı olarak morfolojik karakterlerini tayin edemez. Bu yüzden floresan mikroskobu ve/veya konfokal mikroskobu gibi diğer görüntüleme teknikleri ile yapısal detaylar ile ilgili çok daha fazla görsel bilgi elde edilir. Bunun yanında sadece süspansiyon halindeki hücreler analiz için uygundur ve hücrelerin dokulardan ayrıştırılarak süspansiyon haline getirilmiş olması gerekir. Ayrıca, akış sitometri cihazları çok kompleks cihazlar olduğundan, tam performans ile güvenilir sonuçlar elde edilmesi için sadece cihaza hakim ve çok iyi eğitim almış operatörlere gereksinim duyulmaktadır.

Akış sitometri'de, hücrenin ve/veya bileşenlerinin kalitatif ve kantitatif analizleri kısaca dört şekilde yapılabilmektedir (Brown ve Wittwer, 2000; Dunphy, 2004; Herzenberg ve ark., 2002; Rahman, 2006). Bunlar;

- 1-Hücrelerin büyüklük ve granül yapısına göre analiz;
- 2-Tek floresan boya kullanılarak işaretlenen monoklonal antikor kullanılarak yapılan analiz;
- 3-Çok renkli floresan boyalar (2-17 renk) ile işaretlenen antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen analiz;
- 4-Hücre içerisinde bulunan antijenlerin ve yapıların hücre zarının geçirgenliğinin artırılması sonucu eklenen floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlar ile yapılan analizi şeklinde sayılabilir (Maecker ve ark., 2005; Wood, 2006).

Akış Sitometri'nin Veteriner Hekimlikte Kullanımı

Akış sitometri cihazı, insan dokularında ve hücrelerinde olduğu kadar, hayvanlara ait doku ve hücrelerinin fiziksel ve fonksiyonel özelliklerinin tespiti içinde kullanılmaktadır (Elizabeth ve ark., 2002; Katherine ve ark., 2000; McSharry, 1994).

Bu cihaz, henüz ticari veteriner teşhis laboratuvarlarında yaygın olarak kullanılmamaktadır. Bunun yanında akış sitometri cihazına sahip akademik

enstitüler, veteriner hekimlik hizmetlerinin rutin teşhisine yönelik sınırlı düzeyde hizmet vermektedirler. Akış sitometri cihazının yerine veteriner hekimlik hizmetleri için Olympus AU-600 gibi hematoloji analiz cihazları yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. Veteriner hekimlik biliminde bu durumun yakın bir gelecekte değişerek, hayvan hastalıklarının tanısının konulmasında hematoloji analiz cihazlarının yerini daha gelişmiş analiz yeteneğine sahip akış sitometri uygulamalarının alacağı düşünülmektedir (McSharry, 1994; Tarrant, 2005). Akış sitometri cihazlarının veteriner hekimlikte daha az kullanılmasının en önemli nedeni, tıp hekimliğine oranla veteriner hekimlikte akış sitometri uygulamalarında kullanılmak üzere ayıraç maddelerin azlığıdır. Ancak daha fazla sayıda monoklonal antikorun ticari olarak elde edilebilir ve kullanılabilir hale gelmesi ile bu cihazın ve tekniğin veteriner hekimlikte de daha yaygın olarak hastalıkların tanısı ve diğer klinik uygulamaları için kullanılabilir (Katherine ve ark., 2000).

Günümüzde gelişmiş batı ülkelerinde, akış sitometri uygulamaları çeşitli hayvan türlerine ait hastalıkların immüнопатolojisi, teşhisi ve aşı geliştirilmesi gibi birçok araştırma alanında sıklıkla kullanılan bir metot olarak yerini almıştır. Bu çalışmaların tamamını bu derlemede özetlememiz imkansızdır. Bu yüzden, derlemenin bu bölümü veteriner hekimlikte akış sitometrinin kullanıldığı belirli disiplinlere ait önemli ve öne çıkan bazı çalışmaların nasıl yapıldığına odaklanmıştır.

Koess ve ark. (2008) sığırlarda erken safhada meme dokusundan subklinik mastitisi, akış sitometri kullanarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları araştırmada öncelikle somatik hücre sayısının belirlenmesinde temel yöntem olan mikroskop ile, akış sitometri kullanımını karşılaştırmışlardır. Akış sitometri ile daha kısa sürede en az 10.000 hücre sayılabildiğini rapor etmişlerdir ve somatik hücre sayımına ilaveten, mastitisin erken dönemde tespiti için gerekli olan yangı hücrelerini belirlemek için polimorfonükleer granülositler için CD11b, lenfositler için CD3, monositler ve makrofajlar için CD14'e

karşı elde edilen uygun monoklonal antikorları kullandılar. Buna ilaveten propidium iodide (PI) florokrom ile hücre içindeki DNA'nın boyaması yapılarak, canlı ve canlı olmayan hücreleri tüm popülasyondan kolaylıkla ayırt edebilmişlerdir. Sonuç olarak akış sitometri kullanarak süttteki lökosit hücreleri; yaşayan ve yaşamayan polimorfonükleer nötrofil, lenfosit ve makrofaj hücreleri olarak ayrılması ile bu hücrelerin popülasyondaki yüzdesinin tespit ettiler. Buna ilaveten canlı polimorfonükleer nötrofillerin tespiti ile memede oluşan yangının hangi dönemde olduğunu ve klinik semptom göstermeden mastitisin akış sitometri ile rutin olarak 10 dk gibi bir sürede tespit edilebildiğini bildirmişlerdir.

Qvist ve ark. (1990) bovine viral diarrhoea virüsünün (BVDV) belirlenmesi için akış sitometri cihazını kullandılar. BVDV'nin kontrol ve mücadelesinde persiste enfekte sığırların belirlenmesi ve sürüden ayrılması önemlidir. Bu yüzden araştırmacılar sığır kanlarındaki mononükleer lökositleri, FITC ve ethidium bromide florokromları ile işaretleyerek, akış sitometri cihazı ile analiz sonucunda BVDV PI hayvanları belirlemişlerdir. Araştırmacılar, PI enfekte hayvanların lökositlerinde BVDV'yi %3.0-21.0 oranında tespit ettiler. Sonuç olarak akış sitometri tekniği kullanılarak, PI sığırlarda lökositlerin sitoplazmasında bulunan BVDV antijenlerinin tespitinin yapılabildiği ve bu uygulamalar için hücre kültürüne gereksinim duyulmadığını belirttiler. Ayrıca bu hızlı tekniğin BVDV enfeksiyonu kontrolü için yakın gelecekte rutin kullanımda yerini alacağını rapor etmişlerdir.

Hussein ve ark. (2002) *Escherichia coli* O157:H7'yi sığır rumen sıvısı ve dışkılarından akış sitometri tekniği kullanarak tespit ettiler. İlgili çalışmada patojenleri işaretlemek için FITC florokromu ile işaretli anti-O157:H7 monoklonal antikorunu kullandılar. Sonuç olarak *E. coli* O157:H7'nin akış sitometri yöntemi kullanılarak tespiti ve miktarının belirlenmesinin, rumen sıvısı ve dışkıda mililitrede 10^4 ile 10^7 hücre düzeyinde

bulduğunda kolaylıkla yapılabildiğini aksi taktirde ön zenginleştirme gerektiğini bildirdiler.

Rath ve ark. (2008) çiftlik hayvanlarında yaptıkları, akış sitometri cihazı kullanılarak sperm analizi ve cinsiyet ayrımı çalışması ile saatte ortalama on milyon spermin %90 saflık ile elde edilmesi imkanının olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar başta sığırlar olmak üzere, keçi ve atlarda, Hoechst florokromu ile hücre çekirdeği boyaması yapılarak, elde edilen grafiklerin yorumlanması sonucu yaşayan X ve Y kromozomlarını taşıyan DNA içeriğine göre sperm ayrımı yaptılar. Bu sayede yüksek verimliliğe sahip boğalardan elde edilen spermlerin ayrımı ile istenilen cinsiyete sahip yavrular elde edilmektedir. Bu uygulama Amerika'da elli Avrupa'da üç merkez tarafından rutin olarak yapılmaktadır. Cansız spermlerin uzaklaştırıldığı, yüksek kalitede ve istenilen cinsiyet kromozomlarına sahip DNA'ları içeren canlı spermler ile yapılan tohumlamalar sayesinde döl tutmama sorunu minimum seviyelere indirilebildiği rapor edilmiştir.

Bordignon ve ark. (2002) akış sitometri cihazını kullanarak kuduz virüsü antijenini, hücre kültüründe başarılı bir şekilde tespit ettiklerini rapor ettiler. Araştırmacılar enfeksiyondan sonra 12, 48 ve 72'nci saatlerde kuduz virüsünün hücre içerisinde replikasyonunu akış sitometri ile incelediler. Akış sitometride yaptıkları analiz sonrasında virüs ile enfekte hücrelerin yüzdesini tespit ettiler. Bu deney için doğal enfekte sığırdan izole edilen "Pasteur virüsü" kuduz virüsü suşunu kullandılar. İzolasyon sonrasında BHK-21 ve C6 hücre hatları, vahşi tip virüs ile enfekte edildi. Virüs antijenini BHK-21 ve C6 hücre hatlarında belirlemek için, daha önceden hazırladıkları ve FITC ile işaretledikleri anti-rabies ribonükleoprotein monoklonal antikorunu hücre içi boyamada kullandılar. Boyama işlemi takiben, enfeksiyondan sonra 12'nci saatte %4.7-7.1, 48'nci saatte %88 ve 72'nci saatte %71-81 virüs ile enfekte BHK-21 hücrelerini akış sitometri ile tespit ettiler. Sonuç olarak, akış sitometrinin hücre kültüründe intrasitoplazmik kuduz virüsünün tespiti için hızlı,

hassas ve güvenilir bir yöntem olduğunu rapor ettiler.

Cole ve ark. (1999) atlarda *Cryptosporidium parvum*'un tespitinde akış sitometri tekniğini, *criptosporidium* oosistlerinin tespiti için altın standart olarak belirtilen asit-fast boyama (AF) yöntemi ve immünofluorescence antikor (IFA) yöntemi ile karşılaştırdılar. Araştırmacılar bu amaç için herhangi bir hastalık semptomu göstermeyen üç adet yetişkin at seçtiler. İlk olarak atlardan 5'er gram taze dışkı örneği toplayarak her bir dışkı örneğinin, oosist yönünden negatif olduğunu asit fast boyama ile teyit ettiler. Sonrasında, daha önceden sığırdan elde edilen ve yoğunluğu bilinen criptosporidial oosistleri (10^8) on katlı sulandırma basamakları şeklinde PBS ile muamele ederek hazırladıkları dışkı örneklerine, yoğunlukları 10^1 , 10^2 , 10^3 , 5×10^3 , 10^4 , 5×10^4 , 10^5 , 5×10^5 ve 10^6 oosist/g olacak şekilde inokule ettiler. Asit fast boyama için sürme preparat işlemini takiben Kinyoun asit-fast boyama kiti kullanarak boyamayı gerçekleştirirken IFA testi için önceden hazırlanan, farklı dışkı-oosist konsantrasyonları ve negatif kontrolde ticari immunofloresan kiti kullandılar. Akış sitometri için ise FITC işaretli oosist spesifik monoklonal antikorlar ile boyama yaparak bu üç testi karşılaştırdılar. Sonuç olarak bir gram dışkıda, asit fast yöntemi ve immunofloresan antikor tekniği ile *C.parvum* oosistlerini %100 sensitivite ile, en az 5×10^5 oosist/gr oranında hazırlanan dışkı-oosist konsantrasyon basamağında tespit ettiler. Akış sitometri ile *C.parvum* oosistlerini en az 5×10^4 oosist/gr dışkı-oosist konsantrasyon basamağında tespit etmişlerdir. Sonuç olarak akış sitometrinin altın standart olarak gösterilen asit-fast ve immunofloresan antikor boyama tekniğine göre 10 kat daha duyarlı bir yöntem olduğunu rapor ettiler.

Barratt-Boyes ve ark. (1992) akış sitometri cihazını kullanarak mavi dil virüsü (BTV) replikasyonunu, *in vitro* olarak enfekte edilen sığır mononükleer hücrelerinde incelediler. Kültüre ettikleri hücreleri mavi dil virüsü ile enfekte edilmesi ardından,

enfeksiyon gelişimini akış sitometri ile tespit etmişlerdir. T hücreleri, B hücreleri, monosit veya granülosit hücreleri, her hücreye spesifik hücre yüzey markırlarını FITC ile işaretli mavi dil virüsüne spesifik monoklonal antikorlar kullanarak mavi dil virüsü antijenlerini tespit ettiler. Sonuç olarak, hücre popülasyonunun tamamına oranla düşük yüzdeye sahip mavi dil virüsü ile enfekte hücrelerin immunofloresan mikroskop tekniği ile tespitinin zor olacağını ve akış sitometrinin kullanılmasının daha avantajlı olduğunu rapor etmişlerdir.

Dean ve ark. (1992) kedilerde feline lösemi virüsünü (FeLV), akış sitometri kullanarak; FeLV'yi enfekte kedilerin myeloid, erythroid ve lenfoid kökenli kemik iliği hücrelerinde tespit etmişlerdir. Bu işlem kısaca, FeLV ile enfekte olan kedilerden elde edilen kemik iliği hücreleri %3'lük paraformaldehide ve %0.5 Triton X-100 ile muamele edilerek plazma membranı geçirgenliği artırılmıştır. Ardından FeLV ile enfekte hücreleri, viral p27 antijenine karşı elde edilen monoklonal antikorları kullanılarak tespit etmişlerdir. Kemik iliğinden elde ettikleri hücre popülasyonu akış sitometride myeloid, erythroid, ve lenfoid hücreler olarak ayrılmıştır. Her hücre grubu içinde, p27 antijeni ile enfekte olduğu tespit edilen hücrelerin yüzdeleri belirlenmiştir. Sonuç olarak her üç hücre grubunda FeLV ile enfekte olduğunu tespit etmişlerdir. Akış sitometri kullanarak yaptıkları bu tip çok parametrelili analizin klasik ışık ve floresan mikroskop kullanarak çok zor olacağını ve akış sitometrinin bunlar karşısında son derece avantajlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Yukarıda örnekleri verilen çalışmalar dışında tüm hayvan türlerine ait; viral, bakteriyel, paraziter etkenler başta olmak üzere immünolojik, patolojik bozuklukların araştırılması ile reproduktif uygulamalara ait yüzlerce çalışma ve araştırma bulunmaktadır. Son dönemde yapılan çalışmalar incelendiğinde, akış sitometri tekniği ile birçok teknik, spesifikite, sensitivite ve hız bakımından karşılaştırılmaktadır. Bilim insanları tarafından akış sitometrinin mevcut kullanılan tekniklere göre son derece duyarlı, hızlı ve

kapsamlı araştırmalar için uygun olduğu rapor edilmektedir. Bu bilgiler ışığında gelişmiş ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de veteriner hekim araştırma-cı ve bilim insanlarının geçerliliğini yitirmeye başlayan bir çok uygulamanın yerini alan akış sitometri cihazının kullanıldığı araştırmalar dizayn etmeleri gerekmektedir. Hayvan hastalıklarının ve özellikle zoonoz hastalıkların erken dönemde, hızlı ve kesin tanısının konulması hem hayvan refahı hem de insan sağlığı açısından son derece önemlidir. Bunun yanı sıra doğum öncesinde boğalara uygulanacak sperm tayini ve ayrımı çalışmaları ile yavruların cinsiyet tespiti ve ayrımı uygulamalarının batılı ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de kullanımına başlanmalıdır. Bu sayede üreticiler daha fazla verim elde ederek, daha sağlıklı ve dengeli hayvan popülasyonları oluşturabilirler. Akış sitometri cihazının veteriner hekimlik uygulamalarında kullanılması, hekimlere gelecekte hastalıklarla mücadelede olduğu kadar enfeksiyonların immünopatolojisine ait birçok bilinmeyeniyi aydınlatmada fayda sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Azkur AK., Kim B., Suvas S., Lee Y., Kumaraguru U., Rouse BT., 2005. Blocking mouse MMP-9 production in tumor cells and mouse cornea by short hairpin (sh) RNA encoding plasmids. *Oligonucleotides*, 15, 72-84.
- Barratt-Boyes SM., Rossitto PV., Stott JL., Maclachlan NN., 1992. Flow cytometric analysis of in vitro bluetongue virus infection of bovine mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, 73, 1953-1960.
- Bordignon J., Ferreira SCP., Caporale GMM., Carrieri ML., Kotait I., Lima HC., Zanetti CR., 2002. Flow cytometry assay for intracellular rabies virus detection. *J. Virol. Methods.*, 105, 181-186.
- Brown M., Wittwer C., 2000. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. *Clin. Chem.*, 46, 1221-1229.
- Cole DJ., Snowden K., Cohen ND., Smith R., 1999. Detection of cryptosporidium parvum in horses: thresholds of acid-fast stain, immunofluorescence assay, and flow cytometry. *J. Clin. Microbiol.*, 37, 457-460.
- Daniel H., 2004. A Review and Applications of Flow Cytometry, Department of Chemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Dec. 17.
- Dean GA., Groshek PM., Mullins JL., Hoover EA., 1992. Hematopoietic target cells of anemogenic subgroup C versus nonanemogenic subgroup A feline leukemia virus. *J. Virol.*, 66, 5561-5568.
- Dunphy CH., 2004. Applications of flow cytometry and immunohistochemistry to diagnostic hematopathology. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 128, 1004-1022.
- Elizabeth GD., Wilkerson MJ., Rush BR., 2002. flow cytometry: clinical applications in equine medicine. *J. Vet. Intern. Med.*, 16, 404-410.
- Flow Cytometry Report, 2008. Market Overview and Industry Survey Executive Summary. Biocompare Surveys and Reports, Published August 29.
- Herzenberg LA., Parks D., Sahaf B., Perez O., Roederer M., Herzenberg LA., 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from stanford. *Clin. Chem.*, 48, 1819-1827.
- Hussein SH., Brandolyn HT., Doug R., 2002. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in bovine rumen fluid and feces by flow cytometry. *Food Control*, 13, 387-391.
- Ibrahim SF., Engh GVD., 2007. Flow cytometry and cell sorting. *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.*, 106, 19-39.
- Katherine MB., Greg AR., Michael GH., 2000. Standardized flow cytometry gating in veterinary medicine. *Methods. Cell. Sci.*, 22, 191-198.
- Kima B., Sarangia PP., Azkur AK., Kaisthaa SD., Rousea BT., 2008. Enhanced viral immunoinflammatory lesions in mice lacking IL-23 responses. *Microbes. Infect.*, 10, 302-312.
- Koess C., Joern H., 2008. Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *J. Dairy. Res.*, 75, 225-232.
- Kumaraguru U., Suvas S., Biswas PS., Azkur AK., Rouse BT., 2004. Concomitant helper response rescues otherwise low avidity CD8 memory CTLs to become

- efficient effectors in vivo. *J. Immunol.*, 172, 3719-3724.
- Maecker HT., Rinfret A., D'souza P., Darden J., Roig E., Landry C., Hayes P., Birungi J., Anzala O., Garcia M., Harari A., Frank I., Baydo R., Baker M., Holbrook J., Ottinger J., Lamoreaux L., Epling CL., Sinclair E., Suni MA., Punt K., Calarota S., El-Bahi S., Alter G., 2005. Standardization of cytokine flow cytometry assays. *BMC Immunol.*, 6, 1471-2172.
- McSharry JJ., 1994. Uses of flow cytometry in virology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7, 576-604.
- Nunez R., 2001. Flow cytometry: principles and instrumentation. *Curr. Issues. Mol. Biol.*, 3, 39-45.
- Palomares O., Yaman G., Azkur AK., Akkoc T., Akdis M., Akdis CA., 2010. Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.*, 40, 1232-1240.
- Peterson RA., Krull DL., Butler L., 2008. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology. *Toxicol. Pathol.*, 36, 117-132.
- Qvist P., Aasted B., Bloch B., Meyling A., Rønsholt L., Houe H., 1990. Flow cytometric detection of bovine viral diarrhoea virus in peripheral blood leukocytes of persistently infected cattle. *Can. Vet. J.*, 54, 469-472.
- Rahman M., 2006. Introduction to flow cytometry. Serotec Ltd. Oxford (UK). Published by Serotec Ltd.
- Rath D., Johnson LA., 2008. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. *Reprod. Domest. Anim.*, 43, 338-346.
- Rose AS., Knox KS., 2007. Bronchoalveolar lavage as a research tool. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.*, 28, 561-573.
- Shapiro HM., 2003. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed. Wiley-Liss, USA.
- Suvas S., Azkur AK., Kim BS., Kumaraguru U., Rouse BT., 2004. CD4+CD25+ regulatory T cells control the severity of viral immunoinflammatory lesions. *J. Immunol.*, 172, 4123-4132
- Suvas S., Azkur AK., Rouse BT., 2006. Qa-1b and CD94-NKG2a interaction regulate cytolytic activity of herpes simplex virus-specific memory CD8 T cells in the latently infected trigeminal ganglia. *J. Immunol.*, 176, 1703-1711.
- Tarrant JM., 2005. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. *Vet. J.*, 170, 278-288.
- Wood B., 2006. 9-color and 10-color flow cytometry in the clinical laboratory. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 130, 680-690.
- Youli Z., Shahjahan M., Chang CC., 2009. Basic principles of flow cytometry. basic concepts of molecular pathology. *Molecular Pathology Library*, 2, 139-146.



Kısırlarda Erken Gebelik Tespiti

Mehmet Osman ATLI^{1✉}, Mehmet KÖSE¹, Ercan KURAR², Aydın GÜZELOĞLU²,

Ahmet SEMACAN³

1. Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Konya.
3. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Konya.

Özet: At yetiştiriciliğinde kısa olan üreme sezonunun iyi değerlendirilip, sezon boşa geçirilmeden kısırlarda gebeliğin oluşturulması öncelikli hedefler arasında yer almaktadır. Sınırlı üreme sezonuna sahip kısırların ülkemizin de içinde bulunduğu coğrafyada ilkbahar aylarında başlayan ovaryum aktiviteleri sonbahara kadar devam etmektedir. Bu süreç içinde reproduktif herhangi bir sorunu olmayan kısırlarda düzenli östrus siklusu sayısı oldukça azdır. Dolayısıyla gebeliğin mümkün olan en kısa zamanda tespitinin kritik önemi bulunmaktadır. Bu amaçla farklı tanı yöntemleri kullanılmasına rağmen, gebeliğin mümkün olan en kısa zamanda teşhisine olanak sağlayacak etkin ve pratik bir yöntem halen ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derleme kapsamında öncelikle kısırların erken gebelik fizyolojisi hakkında kısaca bilgi verilecektir. Mevcut gebelik tanı yöntemleri (östrusların izlenmesi, rektal palpasyon, ultrasonografi, progesteron, östrojen, eCG, erken gebelik faktörünün ölçümü ve gebeliğe bağlı gen ekspresyonları ile gebelik tespiti) avantajları ve dezavantajları açısından tartışılacaktır. Ayrıca, gebeliğin maternal kabul mekanizmasının moleküler düzeyde anlaşılması amacıyla yapılan güncel çalışmalar ve gebeliğin tanısında alternatif yaklaşımlar hakkında bilgi verilecektir.

Anahtar kelimeler: Erken gebelik tespiti, Kısırak.

Early Detection of Pregnancy in Mares

Abstract: It is important in horse breeding that mares need to get pregnant at end of short breeding season. Mares have a short breeding season characterized with ovarian activity and it lasts from spring to autumn in our country. During the season number of regular estrous cycles is very few even if the mares are sound reproductively. Therefore, pregnancy diagnosis as early as possible after breeding remains critically important. Even though clinical methods and laboratory analysis are commonly used, there is still a need for an economical, dependable and practical method for diagnosing pregnancy in early period of pregnancy. In this review, a brief information about physiology of early pregnancy in mares will be given. Furthermore, current pregnancy diagnosis methods (estrus detection, rectal palpation, ultrasonography, measurements of progesterone, estrogen, eCG and early pregnancy factor and gene expressions due to the pregnancy) will be discussed in detail including their advantages and disadvantages. Also, current conceptions about molecular mechanism of maternal recognition of pregnancy in mare will be evaluated and alternative pregnancy diagnosis methods will be discussed.

Key words: Early pregnancy detection, Mare.

GİRİŞ

Sportif ve hobi amaçlı at yetiştiriciliği Türkiye’de her geçen gün artmaktadır. At yetiştiriciliğinin ekonomik sınırlar içerisinde devam ettirilebilmesi için bu hayvanlardan yılda bir yavru alınması hedeflenmektedir. Kısırlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, yıl içinde sınırlı sayıda düzenli östrus göstermektedirler. Dolayısıyla gebeliğin aşımı takiben kısa bir sürede güvenilir ve uygulanabilir bir teşhis yöntemi ile belirlenmesinin kritik önemi bulunmaktadır. Bununla birlikte özellikle ikiz gebeliklerin kısırlar için istenmeyen bir durum olmasından dolayı erken gebelik teşhisinin önemi daha da artmaktadır. Sunulan bu derleme kapsamında kısaca kısırların erken gebelik fizyolojisi hakkında bilgiler verilecek, ayrıca günümüzde uygulanan veya geliştirilmeye çalışılan gebelik teşhis yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları sunulmaya çalışılacaktır.

Kısırlarda Erken Gebelik

Kısırların büyük bir kısmı (%90) mevsime bağlı poliöstrik hayvanlar olup, Türkiye sınırları içinde seksüel aktivitelerini ilkbahar-sonbahar ayları arasında göstermektedirler (Şenünver ve ark., 1995). Kısırlarda ırka göre değişmekle birlikte bir üreme sezonunda düzenli ve ovulasyonla sonuçlanan östrus siklusu sayısı sınırlı olup 3-6 adet arasında değişmektedir. (Hyland 1990; England 2005). Kısırlarda östrus siklusu folliküler faz ve luteal faz olarak iki döneme ayrılır. Aşım sezonu içerisinde siklik aktivitenin düzenli olarak gözleendiği ve 4-6 gün süren östrus döneminde (folliküler faz) kısarak çiftleşmek için aygırı kabul etmektedir. Ovulasyonun şekillendiği bu dönemde, genital kanalda spermatozoonların taşınmasını kolaylaştırıcı mekanizmalar şekillenmektedir. Ovulasyon sonrası kısrağın aygırı red ettiği, genital kanalın embriyo için hazırlandığı diöstrus dönemi (luteal faz) 15-17 gün sürmektedir (Daels ve Hughes, 1993; Allen ve Antczak, 2000). Eğer uygun bir doğal aşım veya suni

tohumlama protokolü uygulanmış (ovulasyondan en az 12 saat önce tohumlanmış kısırlarda) ise gebelik şekillenebilir.

Diğer evcil hayvanlar ile kıyaslandığında, kısırların gebelik sürecindeki bazı olaylar farklı özellikler taşımaktadır. Örneğin; sadece fertilize olan oosit hücre (zigot) uterus içerisine taşınmakta, fertilize olmayan oositler oviduktlar içerisinde tutularak birkaç ay içinde tamamen dejenere olmaktadır. Embriyonun ovidukt içerisindeki transferi domuz (48 saat) ve ruminantlar (72 saat) ile kıyaslandığında daha uzun sürede (144–152 saat) olmaktadır. Kısırlarda gebeliğin maternal olarak tanınmasında rol oynayan molekül veya moleküller günümüzde halen karakterize edilememiştir. Bununla beraber gebeliğin maternal kabulü için embriyonun uterus içerisinde kornular ve korpus arasında hareket etmesi (migrasyon) zorunludur ve bu dönemde embriyo oldukça hareketlidir. Kısarak embriyosu diğer evcil hayvan türleri ile kıyaslandığında daha uzun süre varlığını sürdüren bir sarı kese yapısına sahiptir. Kısarak embriyosunun etrafı; gebeliğin 6,5. gününden 22. güne kadar glikokaliks yapısında bir kapsül ile çevrelenmiştir. (McDowell ve ark., 1988; Oriol ve ark., 1993; Battut ve ark., 1997; Ginther, 1998; Allen, 2000; Allen, 2001; Allen, 2005; Allen ve Wilsher, 2009).

Fertilizasyondan sonra, fetal hayatın başlangıcına kadar, embriyo uterus içerisine girdiği 6. günden itibaren mobilizasyon, fiksasyon ve orientasyon dönemleri geçirmektedir (Ginther, 1998). Daha sonra embriyo 40. günde uterusu implante olmaya başlar. Bu dönem içinde trofoblast hücrelerinin bir kısmı farklılaşarak kısırlarda gebeliğin devamını sağlamaktan sorumlu progesteronu salgılatan sekonder korpus luteumları şekillendirecek olan eCG (equine chorionic gonadotropin) hormonunu salgılayacak olan endometrial kapları şekillendirir (Allen, 2001).

Kısraklarda Gebelik Teşhisinde Kullanılan Yöntemler

Kısraklarda üreme performansının iyileştirilmesinde erken dönemde yapılan gebelik muayenesinin önemli rolü bulunmaktadır. Yapılan bu muayenede esas amaç gebeliğin erken tanısından ziyade gebe olmayan kısrakların mümkün olan en erken dönemde belirlenmesi olup bu sayede gebe olmadığı belirlenen kısrakların ilk östrus periyodunda tekrar doğal aşım veya suni tohumlamaya tabi tutulmaları mümkün olabilmektedir (Gordon, 1997). Kısrakların erken dönemde gebelik durumlarını belirlemek amacıyla östrusun dış belirtileri, rektal palpasyon ve ultrasonografik muayene gibi klinik muayene yöntemleri yanısıra çeşitli hormonların (progesteron, östrojen, Equine Chorionic Gonadotropin) seviye ölçümleri, erken gebelik faktörü ile gebeliğe bağlı genlerin ekspresyonunun tespiti gibi laboratuvar yöntemlerinden de yararlanılmaktadır.

Klinik Yöntemler

Östrusun Gözlenmesi: Özellikle çalışan personelin ve hayvan sahiplerinin sıklıkla başvurdukları bir gebelik teşhis yöntemidir. Genellikle bir önceki östrusta çiftleştirilen kısırağın tahmini olarak bir sonraki östrus göstereceği günlerde (yaklaşık 21. gün) aygıra gösterilerek veya östrus belirtileri izlenerek uygulanmaktadır. Kısraklarda östrus siklus süresinin aşım sezonu aylarına göre 17-24 gün arasında değişmesi, diöstrus ovulasyonları nedeniyle siklus süresinin uzayabilmesi, embriyonik ölüm, dış bozukluğu, paraziter hastalıklar, beslenme bozukluğu, ilk defa aşımaya alınan damızlıkların veya tay kızgınlığında aşım yaptırılacak olan kısrakların sinirli ya da ürkek olması gibi nedenlerden dolayı bazı kısraklarda davranış anöstrusu (suböstrus) meydana gelebilmektedir. Dolayısıyla, kısrakta beklenen zamanda östrusun dış belirtileri gözlenemeyebilir. Bunların yanısıra siklusta ve gebeliğin ilk 35-40. gününe kadar olan dönemde her

10-12 günde bir gerçekleşen Folikül Stimulating Hormon (FSH) dalgalanmasının etkisiyle bazı kısraklarda gebe olduğu halde östrus belirtilerinin görülmesinden dolayı kısrakların gözlenmesi ya da aygırla kontrol edilmesi tek başına gebelik hakkında fikir verebilecek güvenilirlikte bir yöntem değildir (Roberts, 1986; England, 2005).

Rektal Palpasyon: Rektal palpasyon yöntemiyle ovaryumların palpasyonu, ovaryumun anatomik özelliği, korpus luteum yapısının palpe edilememesi yanısıra her dönemde büyük folliküllerin var olma durumundan dolayı gebelik teşhisi için her zaman tercih edilmemektedir. Fakat gebeliğin 14-15. gününden itibaren rektal palpasyonla belirlenebilen uterus tonusundaki değişimler gebelikle ilgili bir bulgu olarak kabul edilmektedir (Roberts, 1986; Pycoc, 2007). Uterus tonusunda meydana gelen artışlar bu dönemde embriyonun uterus içerisinde hareketli olmasından kaynaklanmaktadır (Cross ve Ginther, 1988). Ayrıca serviks sıkıca kapalıdır ve rektal muayenede kolaylıkla pelvis tabanında hissedilebilir. Gebeliğin 60. gününe kadar uterus tonusu hala belirgindir ve uterus kornusu içinde embriyoya ait şişkinlik hissedilebilir. (Roberts, 1986; Pycoc, 2007). Tüm bunların yanında rektal palpasyonun bazı dezavantajları vardır. Özellikle postpartum dönemde aşım yaptırılan kısraklarda uterus tonositesi her zaman hissedilememektedir. Kısrakların büyük çoğunluğunun tay kızgınlığında aşım yaptırıldığı dikkate alındığında erken dönemde rektal palpasyonla gebelik tanısının doğruluk oranı oldukça azalmaktadır. İlave olarak rektumda şekillenebilecek yırtığa bağlı oluşan şiddetli ıkmama, sancı ve peritonitisin kısırağın ölümüne neden olması, rektal muayeneyi tecrübesiz hekimlerin başvurmadan kaçındığı bir yöntem haline getirmektedir (Sayegh ve ark., 1996; Foristall ve ark., 1998).

Ultrasonografi: Ultrasonografi, kısraklarda erken dönemde gebelik tanısı amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve transrektal olarak yapılmaktadır. Embriyonik kapsül yapısından dolayı embriyonik kese (2 mm) ovulasyondan sonra 10.

günden itibaren ultrasonografi ile gözlemlenebilmektedir. Embriyonun 17. güne kadar uterus içinde hareketli olmasından dolayı her iki kornuda gebelik için dikkatli bir şekilde araştırılmalıdır. Ovulasyondan 22 gün sonra embriyonik kalp atışları ultrasonografi ile izlenebilir (Kahn, 1994; Kılıçarslan ve ark., 1996). Özellikle ikiz gebeliklerin belirlenip birinin elimine edilebilmesi ve eğer kısarak gebe değilse bir sonra siklus için aşım programının yapılabilmesi için ilk ultrasonografik muayene genelde ovulasyondan sonra 14-16. günler arasında yapılmaktadır. İkinci muayene, erken embriyonik ölümlerin belirlenmesi, embriyonik fiksasyonun uygunluğu ve kalp atımları ile embriyonun canlılığının izlenmesi için 21-22. günler arasında uygulanmaktadır. Geç dönemde oluşan embriyonik ölümlerin tespiti ve endometrial kapların izlenerek gebeliğin gidişatı hakkında bilgi alınması için üçüncü ultrasonografi muayenesi ise 35-40. günler arasında yapılmaktadır (Pycock, 2007). Ultrasonografi ile embriyonik vezikül 9-10. günde (%30) görülebilse de (Kahn, 1992), embriyonun 17. güne kadar hareketli olmasından dolayı ancak 20. günden sonra kesin olarak gözlenebilmektedir. Muayenenin iyi bir deneyim gerektirmesi ve bu dönemdeki embriyonik vezikülün uterus kistleri ile kolaylıkla karıştırılabilmesi erken dönemde ultrasonografi ile gebelik tespitinde dikkat edilmesi gereken hususlardır (Ginther, 1992; Kahn, 1992). Ayrıca erken dönemde ultrasonografi ile gebelik tanısının sadece rektal yolla yapılabilmesi rektal palpasyon kısmında bahsedilen riskleri de öne çıkarmaktadır.

Laboratuvar Yöntemleri

Progesteron Ölçümü: Ovulasyon sonrası gelişen CL'dan üretilen progesteron seviyesi gebeliğin 6-14.günler arasında 8-15 ng/ml seviyesi ile pik düzeye ulaştıktan sonra tedricen azalarak 30-35.günlere kadar 4-6 ng/ml seviyesine iner.Daha sonra eCG'nin etkisiyle sekonder CL'den dolayı tekrar yükselerek 8-25 ng/ml seviyelerine ulaşır ve yaklaşık 150.güne kadar bu seviyelerde kalır (Daels ve Hughes, 1993; Gordon, 1997; Bergfelt ve Adams, 2007).

Gebe kısırlarda progesteron hormonunun bu seyri nedeniyle gebeliğin teşhisi amacıyla kullanılabilir. Gebe kısırlarda ovulasyon sonrası 18-20. günlerde progesteron düzeyi >1 ng/ml'dir (Nett ve ark., 1976; Gunther ve ark., 1980; McKinnon, 1993; England, 2005; Bergfelt ve Adams, 2007). Ancak uzayan diöstrüs, erken embriyonik ölüm, örneklemenin hatalı zamanda yapıldığı veya kısa östrüs siklusu oluşan kısırlarda progesteron düzeyi yüksek olacağından sonuçların yanlış pozitif olarak yorumlanabileceği unutulmamalıdır. Nadir olarak bazı gebe kısırlar kısa süreli olarak düşük progesteron düzeyine sahip olabilirler (Roberts, 1986; England, 2005).

Östrojen Ölçümü: Östrojenler erken dönemde (gebeliğin 12. gününde) embriyo tarafından üretilmeye başlanır. Ancak üretilen östrojen miktarı çok düşük olduğundan kan plazmasında ölçülebilecek düzeye ulaşamaz ve lokal bir üretim olarak kalır. Östrojen miktarı bakımından gebe ve gebe olmayan kısırlarda 30. güne kadar fark olmadığı, 35-40. günlerde ise gebelerde 2-3 kat arttığı bildirilmiştir. Bu günlerde oluşan artışın eCG'nin salınımı sonrası gelişen sekonder luteal yapıların oluşumu ile yakın ilişkili olduğu ifade edilmektedir (Daels ve ark., 1990; Daels ve ark., 1991; Daels ve ark., 1998; McKinnon ve Pycock, 2007). İdrar veya plazmada östrojen seviyesinin ölçümüyle güvenilir gebelik teşhisi ancak 60. günden sonra yapılabileceği belirtilmektedir. İleri dönem gebeliklerin izlenmesinde kullanılacak olan fetal ovarium kaynaklı östrojen ise 210. günde pik seviyeye ulaşmaktadır (Nett ve ark., 1975, Gordon, 1997). Bu nedenle erken gebelik teşhisi için östrojenin hiçbir klinik önemi yoktur.

Equine Chorionic Gonadotropin (eCG) Ölçümü: Uterus endometriyumuna gömülü haldeki fetal trophoblast hücrelerinden üretilen eCG veya diğer adıyla PMSG hormonu, gebeliğin 35-40. günlerinde plazmada ölçülebilir düzeye ulaşan, 60-65.günlerde pik seviyeye çıkan, 80-120. günlere kadar üretilen ve 150. güne kadar azalan bir gonadotropindir (McKinnon, 1993; Gordon, 1997; Allen, 2000). Doğru

gebelik teşhisi için en uygun eCG ölçüm zamanının gebeliğin 50. gününden sonraki dönemler olduğu belirtilmektedir (Collins ve Buckley, 1993; Aslan ve ark., 1997). Endometriyal kapların şekillendiği 35.günden itibaren 120-150.güne kadarki dönemde abortus şekillense bile endometriyal kaplar hala fonksiyonel olacağından bu dönemde yapılan testlerde yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği belirtilmektedir (Mitchell, 1971; Gordon, 1997; England, 2005). Bazı durumlarda ise endometriyal kapların immunolojik retlerinin çok erken oluşması nedeniyle gebelik devam etmesine rağmen üretilen eCG düzeyinin çok düşük veya ölçülemeyecek düzeyde olabileceği bildirilmektedir (Fay ve Douglas, 1982). Ayrıca, katır ve bardo gebeliklerinde endometrial kaplar şekillenmediğinden eCG ölçümü yapılamaz (England, 2005).

Erken Gebelik Faktörü (EGF) Ölçümü: Kısırlarda ve bazı hayvan türlerinde gebeliğin erken döneminde özellikle maternal kabul ve luteal fonksiyonların sürekliliğini sağlamaya yönelik uyarıcıların embriyo tarafından üretildiği belirlenmiştir. Bu uyarıcıların immunolojik testlerle belirlenmesine dayalı gebelik teşhis yöntemleri bulunmaktadır. Kısırlarda erken gebelik faktörü (EGF) adı verilen ve immun sistemi baskılayıcı özelliği olan bir glikoprotein, fertilizasyonu takiben 2. günde serumda tespit edilebilmektedir (Takagi ve ark., 1998; Ohnuma ve ark., 2000). Ancak bu proteinin varlığının tespiti Rosette Inhibition Test (RIT) adı verilen oldukça kompleks bir yöntemle yapılabilmektedir. RIT testi için, gebelik testi yapılacak kısırlardan serum toplanması, diğer sağlıklı bir attan lenfosit izolasyonu ve bu lenfositlere karşı tavşanlardan anti-serum elde edilmesi, koyun, insan veya ratlardan eritrosit izole edilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile bu test pratik olarak kabul edilmemektedir (Takagi ve ark., 1998).

Son yıllarda tohumlama sonrası 3-30. günlerde kan serumunda EGF glikoproteinine karşı üretilmiş antikörlerin belirlenmesine yönelik pratik bir test kiti (Concepto-Diagnostics Corporation) geliştirilmiştir.

Üretici firma belirtilen kit ile gebelik teşhisinin %95'in üzerinde doğrulukla yapılabildiğini ifade etmektedir. Ancak, yapılan bilimsel çalışmalarda bu testin kısırlar ve sığırlar için çok yüksek doğrulukla güvenilir olmadığı, erken ve doğru gebelik tespiti yönünden klasik gebelik yöntemlerine özellikle ultrasonografik muayeneye alternatif olamayacağı ortaya konulmuştur (Cordoba ve ark., 2001; Gandy ve ark., 2001; Metcalf ve ark., 2004; Horteloup ve ark., 2005; Parker ve ark., 2005).

Gebeliğe Bağlı Genlerin Ekspresyonu ile Gebelik Tayini: Fertilizasyon sonrası gebeliğin oluşması ve devam edebilmesi için çeşitli faktörlerin koordineli bir şekilde çalıştığı günümüzde yapılan çalışmalar ile ortaya konulmuştur (Weber ve ark., 1991; Atlı ve ark., 2010; Klein ve ark., 2010; Atlı ve ark., 2011). Embriyo, paternal gen allellerini taşımasından dolayı allojenik yapıda olup, annenin immün sistemi tarafından potansiyel yabancı bir organizma olarak kabul edilmektedir. Embriyonun gelişimine devam edebilmesi için varlığını çeşitli sinyaller ile bildirmesi ve annenin immün sistemi tarafından kabul edilmesi gerekmektedir (Allen ve Antczak, 2000; Allen, 2005). Ayrıca fiziksel olarak embriyonun oviduktan uterusu taşıyabilmesi için PGE₂ salgılaması ve uterus içinde ise endometrial PGF sekresyonunu durdurması gerekmektedir (McDowell ve ark., 1988; Weber ve ark., 1991; Ginther, 1998; Allen, 2001). Bu faktörlerin özellikle kanda yaptığı değişikliklerin izlenmesi ile gebelik tespit edilebileceği düşünülmüştür.

İmmunolojik olarak embriyonun paternal Major Histocompatibility Complex (MHC) ekspresyonunun başladığı erken gebelik döneminde (7.gün), sığır kan lenfositlerinde adreno kortikotropik hormon (ACTH) salgılamaktadır (Dixit ve Parvizi, 2000; Dixit ve Parvizi, 2001). Hücre içi mikroorganizmalara karşı hücrel immünite etkin olarak kullanılmasına rağmen, gebelikte humoral bağışıklık tercih edilmektedir (Wilder, 1998). İmmün sistemde gözlenen bu radikal değişime Th-1 sitokinlerden, Th-2 sitokinlere geçişin neden olduğu belirtilmektedir

(Wegmann ve ark., 1993; Reinhard ve ark., 1998). Th-1 sitokinlerinin baskın olması embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Hill ve Choi, 2000). Gebelik süresince sığır lenfositlerinden salgılanan nitrik oksit (NO), Th-1 lenfositlerden Th-2 lenfositlere geçişi sağlayarak immün sistemi baskılamaktadır (Dixit ve Parvizi, 2001; Roozendaal ve ark., 1999).

Ruminant embriyolarında salgılanan interferon-tau'nun (IFN-tau) immün sistemi baskılayıcı etkiye sahip olması nedeniyle maternal kabulde en önemli etken olarak kabul edilmektedir. İn vitro fertilizasyon (IVF) uygulamalarında ortama GM-CSF katılması, koyun embriyolarında daha erken ve fazla miktarda IFN-tau'nun üretilmesine neden olmaktadır (Rooke ve ark., 2005). Sığır embriyosundan salgılanan INF-tau'nun etkisi ile uterus dışındaki dokularda özellikle periferik kan mononükleer hücrelerinde (PKMH) IFN-tau'nun ISGs genlerinin (INF-tau stimulated genes) ekspresyonlarını etkilediği tespit edilmiştir. Örneğin, ISG'lerden 2-5 oligoadenylate synthetase 1 (OAS1), myxovirus resistance gene-1 (Mx-1), Mx-2 ve interferon-stimulated gene 15 kDa protein (ISG15) ekspresyonunun erken gebelik dönemlerinde sığır ve koyun PKMH'de önemli oranda arttığı gözlenmiştir (Gifford ve ark., 2007; Oliveira ve ark., 2008; Green ve ark., 2010). Pratik olarak toplanabilen PKMH'lerinde ISGs ekspresyon seviyelerinin özellikle düvelerde gebeliğin 18. gününden sonra teşhiste kullanılabileceği bildirilmektedir (Green ve ark., 2010).

Ancak, kısarak embriyosu tarafından IFN-tau salgılanmamaktadır. Dolayısıyla, PKMH'de ISGs ekspresyonları değişiklik göstermediğinden gebelik teşhisinde belirleyici markır olarak kullanılamayacağı bildirilmiştir (Hicks ve ark., 2003). Erken gebelikte embriyo tarafından salgılanan diğer faktörlerin (PGF₂, PGE₂ ve östrojen) annenin immün sistemini etkilediği bilinmektedir. Bu durum at lenfositlerinde bazı genlerin ekspresyon profillerinin erken gebelik teşhisinde kullanılabileceği fikrini gündeme getirmiştir. Fertilizasyon sonrası at embriyosu tarafından

üretilen prostaglandin E₂ (PGE₂), Th-1 sitokinlerini (IL-2, IFN- γ , TNF- α) baskılamakta, ancak Th-2 sitokinlerinin (IL-4, IL-5, IL-10) üretimini uyarmaktadır (Meyer ve ark., 2003; Trebble ve ark., 2003; Walker ve Rotondo, 2004). Özellikle, kan dokusunda (PKMH) meydana gelen immünojik değişikliklerin moleküler düzeyde tespitinin, alternatif gebelik tespit yöntemlerinin geliştirilmesine alt yapı oluşturması beklenmektedir. Örneğin, erken gebelik döneminde bazı aday genlerin PKMH'de ekspresyonları transkripsiyon seviyesinde araştırılmıştır (Kurar ve ark., 2011). Kısarak PKMH'den izole edilen total RNA örneklerinde prostaglandin E synthase (PGES), IL-5 ve nitric oxide synthase (iNOS) gen ekspresyonları tespit edilememiştir. Ancak ACTH'ı kapsayan polisistronik proopiomelanocortin (POMC), IL-4 ve IL-10 gen ekspresyonları gebe ve siklik kısaraklarda tespit edilmiştir. Ancak, yalnız IL-10 ekspresyonu gebe kısaraklarda sikliklere göre 0. ve 4. günlerde önemli derecede (P< 0.05) düşük bulunmuştur. Benzer şekilde, doğal bağışıklığın önemli bir parçası olan Toll-like reseptör (TLR) genlerinin (1-10) ekspresyonları at PKMH'de tespit edilmiştir. Ancak gebe ile gebe olmayan kısarakların TLR (1-10) genlerinin ekspresyonları arasında önemli bir fark bulunamamıştır (Kurar ve ark., 2012). Diğer aday genlerin atların erken gebelik döneminde ekspresyon seviyelerinin araştırılması gebelik immünolojisinin anlaşılmasına ve gebelik tespitinde kullanılabilecek markır gen ve faktörlerin tespitine olanak sağlayacaktır. Bu amaçla özellikle mikroarray teknolojisi ile transkriptom analizlerinin kullanılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇ

Sonuç olarak kısaraklar için saha şartlarında gebelik tespiti amacıyla ultrasonografiden yaygın olarak yararlanılmakla birlikte günümüzde özellikle moleküler biyoloji tekniklerin ilerlemesi ve erken gebelikteki fizyolojik olayların anlaşılmasına yönelik çalışmaların artışı ile laboratuvar teknikleri kullanılarak erken gebeliğin tespit edilmesine yönelik çalışmaların sayısı artmaya başlamıştır. Bunlarla

birlikte özellikle embriyo transfer çalışmalarının ilerlemesi ile embriyonun yıkanmasından önce (7. günde) kısırlarda gebeliği teşhis edebilecek yöntemlere halen ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Allen WR., 2000. The physiology of early pregnancy in the mare. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 40, 338-354.
- Allen WR., Antczak DF., 2000. Reproduction and modern breeding technologies in the mare. In "The Genetics of the Horse", Eds., A Bowling, A Ruvinsky, CAB International, NY, USA.
- Allen WR., 2001. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod. Dom. Anim.*, 36, 121-131.
- Allen WR., 2005. Maternal recognition and maintenance of pregnancy in the mare. *Anim. Reprod.*, 2, 209-223.
- Allen WR., Wilsher S., 2009. A review of implantation and early placentation in the mare. *Placenta*, 30, 1005-1015.
- Aslan S., Findik M., Izgür H., Çelebi M., Çelebi M., 1997. Pregnancy diagnosis by using PMSG-Latex Test in mares. *Tr. J. Vet. Anim. Sci.*, 21, 195-199.
- Atli MO., Kurar E., Kayis SA., Aslan S., Semacan A., Celik S., Guzeloglu A., 2010. Evaluation of genes involved in prostaglandin action in equine endometrium during estrous cycle and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 122, 124-132.
- Atli MO., Guzeloglu A., Dinç DA., 2011. Expression of wingless type (WNT) genes and their antagonists at mRNA levels in equine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Anim. Reprod. Sci.*, 125, 94-102.
- Battut I., Colchen S., Fieni F., Tainturier D., Bruyas JF., 1997. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet. J., Suppl.*, 25, 60-62.
- Bergfelt DR., Adams GP., 2007. Ovulation and corpus luteum development. In "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycock, AO McKinnon, W.B. Saunders Elsevier, USA.
- Collins AM., Buckley TC., 1993. Comparison of methods for early pregnancy detection. *J. Equi. Vet. Sci.*, 13, 627-630.
- Cordoba MC., Sartori R., Fricke PM., 2001. Assessment of a commercially available early conception factor (ECF) test for determining pregnancy status of dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 84, 1884-1889.
- Cross DT., Ginther OJ., 1988. Uterine contractions in nonpregnant and early pregnant mares and jennies as determined by ultrasonography. *J. Anim. Sci.*, 66, 250-254.
- Daels PF., Shideler S., Lasley BL., Hughes JP., Stabenfeldt GH., 1990. Source of oestrogen in early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, 90, 55-61
- Daels PF., DeMoraes JJ., Stabenfeldt GH., Hughes JP., Lasley BL., 1991. The corpus luteum: source of oestrogen during early pregnancy in the mare. *J. Reprod. Fertil.*, 44, 501-508.
- Daels PF., Hughes JP., 1993. The normal estrous cycle. In "Equine Reproduction", Eds., AO McKinnon, JL Voss JL, 1st edition, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- Daels PF., Albrecht BA., Mohammed HO., 1998. Equine chorionic gonadotropin regulates luteal steroidogenesis in pregnant mares. *Biol. Reprod.*, 59, 1062-1068.
- Dixit VD., Parvizi N., 2000. Lymphocytic secretion of adrenocorticotrophic hormone throughout pregnancy in cows and its possible physiological role. *Reprod. Domes. Anim.*, 3-4, 171.
- Dixit VD., Parvizi N., 2001. Pregnancy stimulates secretion of adrenocorticotropin and nitric oxide from peripheral bovine lymphocytes. *Biol. Reprod.*, 64, 242-248.
- England GCW., 2005. Fertility and Obstetrics in the Horse. 3rd edition., Blackwell Publishing, Indian.
- Fay JE., Douglas RH., 1982. The use of radioreceptor assay for the detection of pregnancy in the mare. *Theriogenology*, 18, 431-444.
- Foristall KM., Roser JF., Liu IKM., Lasley B., Munro CJ., Carneiro GF., 1998. Development of a Tandem Hormone Assay for the detection of pregnancy in the Miniature Mare. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 44, 52-53.

- Gandy B., Tucker W., Ryan P., Williams A., Tucker A., Moore A., Godfrey R., Willard S., 2001. Evaluation of the early conception factor (ECF) test for the detection of nonpregnancy in dairy cattle. *Theriogenology*, 56, 637-647.
- Gifford CA., Racicot K., Clark DS., Austin KJ., Hansen TR., Lucy MC., Davies CJ., Ott TL., 2007. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90, 274-280.
- Ginther OJ., 1992. Reproductive biology of the mare. In "Basic and Applied Aspect", Ed., OJ Ginther, USA Equieservices, Cross Plains, WI, USA.
- Ginther OJ., 1998. Equine pregnancy: physical interactions between the uterus and conceptus. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, 73-104.
- Gordon I. Controlled Reproduction in Horses, Deer and Camelids. CAB International, UK. 99-118.
- Green JC., Okamura CS., Pooock SE., Lucy MC., 2010. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20 d after insemination in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 121, 24-33.
- Gunther JD., Foley CW., Gaverick HA., Plotka ED., 1980. Comparison of milk and blood plasma progesterone concentrations in cycling and pregnant mares. *J. Anim. Sci.*, 51, 1131-1138.
- Hicks BA., Etter SJ., Carnahan KG., Joyce MM., Assiri AA., Carling SJ., Kodali K., Johnson GA., Hansen TR., Mirando MA., Woods GL., Vanderwall DK., Ott TL., 2003. Expression of the uterine Mx protein in cyclic and pregnant cows, gilts, and mares. *J. Anim. Sci.*, 81, 1552-1561.
- Hill JA., Choi BC., 2000. Immunodystrophism: evidence for a novel alloimmune hypothesis for recurrent pregnancy loss involving Th1-type immunity to trophoblast. *Semin. Reprod. Med.*, 18, 401-405.
- Horteloup MP., Threlfall WR., Funk JA., 2005. The early conception factor (ECFTM) lateral flow assay for non-pregnancy determination in the mare. *Theriogenology*, 64, 1061-1071.
- Hyland JH., 1990. Reproductive endocrinology: it's role in fertility and infertility in the horse. *Br. Vet. J.*, 146, 1-16.
- Kahn W., 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in female animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.*, 28, 1-10.
- Kahn W., 1994. *Veterinary Reproductive Ultrasonography*. 1st edition., Mosby-Wolfe, London, England.
- Kılıçarslan MR., Soylu MK., Şenünver A., Kırşan İ., Carioğlu B., 1996. The use of ultrasonografik techniques for the diagnosis of early pregnancy in mares. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 2, 147-150.
- Klein C., Scoggin KE., Ealy AD., Troedsson MH., 2010. Transcriptional profiling of equine endometrium during the time of maternal recognition of pregnancy. *Biol. Reprod.*, 83, 102-113.
- Kurar E., Atli MO., Güzeloğlu A., Semacan A., 2011. POMC, INOS, PGES, IL-4, IL-5 and IL-10 gene expression in peripheral blood mononuclear cells of cyclic and pregnant mares. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 17, 319-323.
- Kurar E., Atli MO., Guzeloglu A., Kayis SA., Semacan A., 2012. Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the equine peripheral blood mononuclear cells (PMBCs) during the early pregnancy and estrous cycle. *Euroasian Vet. J.*, Article in press.
- McDowell KJ., Sharp DC., Grubaugh W., Thatcher WW., Wilcox CJ., 1988. Restricted conceptus mobility results in failure of pregnancy maintenance in mares. *Biol. Reprod.*, 39, 340-348.
- McKinnon AO., 1993. Diagnosis of Pregnancy. In "Equine Reproduction", Eds., AO McKinnon, JL Voss, Lea & Febiger, Philadelphia, USA.
- McKinnon AO., Pycocock JF., 2007. Maintenance of pregnancy. In "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycocock, AO McKinnon, W.B. Saunders Elsevier, USA.
- Metcalf ES., McCue P., Jasko DJ., Roor JB., 2004. Evaluation of a test for equine early conception factor. 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado, USA.
- Meyer F., Ramanujam KS., Gobert AP., James SP., Wilson KT., 2003. Cutting edge: cyclooxygenase-2 activation

- suppresses Th1 polarization in response to *Helicobacter pylori*. *J. Immunol.*, 171, 3913-3917.
- Mitchell D., 1971. Early fetal death and a serum gonadotrophin test for pregnancy in the mares. *Can. Vet. J.*, 12, 41-44.
- Nett TM., Holtan DW., Estergreen VL., 1975. Oestrogens, LH, PMSG, and prolactin in serum of pregnant mares. *J. Reprod. Fertil.*, 23, 457-462.
- Nett TM., Pickett EW., Seidel GE., Voss JL., 1976. Levels of luteinizing hormone and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in mares. *Biol. Reprod.*, 14, 412-415.
- Ohnuma K., Yokoo M., Ito K., Nambo Y., Miyake YI., Komatsu M., Takahashi J., 2000. Study of early pregnancy factor (EPF) in equine (*Equus caballus*). *Am. J. Reprod. Immunol.*, 43, 174-1799.
- Oliveira JF., Henkes LE., Ashley RL., Purcell SH., Smirnova NP., Rao Veeramachaneni DN., Anthony RV., Hansen TR., 2008. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- τ release from the uterine vein. *Endocrinology*, 149, 1252-1259.
- Oriol JG., Sharom FJ., Betteridge KJ., 1993. Developmentally regulated changes in the glycoproteins of the equine embryonic capsule. *J. Reprod. Fert.*, 99, 653-664.
- Parker E., Tibary A., Vanderwall DK., 2005. Evaluation of a new early pregnancy test in mares. *J. Equi. Vet. Sci.*, 25, 66-69.
- Pycock JF., 2007. Pregnancy diagnosis in the mare. "Current Therapy in Equine Reproduction", Eds., JC Samper, JF Pycock, AO McKinnon, Saunders Elsevier, USA.
- Reinhard G., Noll A., Schlebusch H., Mallmann P., Ruecker AV., 1998. Shifts in the TH1/TH2 balance during human pregnancy correlate with apoptotic changes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 933-938.
- Roberts SJ., 1986. Gestation and pregnancy diagnosis in the mare. In "Current Therapy in Theriogenology", Ed., DA Marrow, WB. 1st edition Saunders Company, Philadelphia, USA.
- Rooke J., Ewen M., McEvoy T., Entrican G., Ashworth C., 2005. Effect of inclusion of serum and granulocyte-macrophage colony stimulating factor on secretion of interferon-tau during the in vitro culture of ovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, 17, 513-521.
- Roosendaal R., Vellenga E., Postma DS., De Monchy JG., Kauffman HF., 1999. Nitric oxide selectively decreases interferon-gamma expression by activated human T lymphocytes via a cGMP-independent mechanism. *Immunology*, 98, 393-399.
- Sayegh AI., Adams SB., Peter AT., Wilson DG., 1996. Equine rectal tears: causes and management. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 18, 1131-1139.
- Şenünver A., Horoz H., Kılıçarslan MR., Konuk SC., Tek Ç., Alkan S., 1995. Kısırlarda östrus ve ovulasyonun PGF2a ile uyarılması. *Bültendif*, 5, 11-14.
- Takagi M., Nishimura K., Oguri N., Ohnumo K., Ito K., Takahashi J., Yasuda Y., Miyazawa K., Sato K., 1998. Measurement of early pregnancy factor activity for monitoring the viability of the equine embryo. *Theriogenology*, 50, 255-262.
- Trebble TM., Wootton SA., Miles EA., Mullee M., Arden NK., Ballinger AB., Stroud MA., Burdge GC., Calder PC., 2003. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78, 376-382.
- Walker W., Rotondo D., 2004. Prostaglandin E2 is a potent regulator of interleukin-12- and interleukin-18-induced natural killer cell interferon-gamma synthesis. *Immunology*, 111, 298-305.
- Weber JA., Freeman DA., Vanderwall DK., Woods GL., 1991. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. *Biol. Reprod.*, 45, 540-543.
- Wegmann TG., Lin H., Guilbert L., Mosmann TR., 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon. *Immunol. Today*, 14, 353-356.
- Wilder RL., 1998. Hormones, pregnancy and autoimmune diseases. *Ann NY. Acad. Sci.*, 840, 45-50.

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ YAYIN ŞARTLARI

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi " Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg." dir.
2. Bu dergide, Veteriner Hekimlik, hayvancılık ve halk sağlığı alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve derlemeler yayımlanır.
3. Makaleler Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmalıdır
4. Makaleler daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış olmalıdır.
5. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)ına aittir.
6. Makaleler değerlendirme için en az iki danışmana gönderilir. Makalenin yayına kabulü, danışmanların ve yayın kurulunun kararına bağlıdır.
7. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'nde yayımlanacak olan hayvan deneylerine dayalı bilimsel çalışmalarda "Etik Kurul Onayı Alınmıştır" ifadesi aranır. Tez çalışmalarından özetlenen makalelerde etik kurul kararı aranmaz.

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. **Makaleler**, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, 16 sayfayı geçmemelidir. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır.
2. **Başlık**: Türkçe ve yabancı dilde yazılmalı, yalnız ilk harfleri büyük olmalıdır (Örn; **Sığırdaki Beta-endorfin Seviyesi**).
3. **Yazar(lar)ın isim ve Soyisimleri**: Yazarların adı ve soyadının (akademik unvanı) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortali gelecek şekilde yazılması gerekir (Örn; **Yakup Kara**).
4. **Sorumlu yazar ve adresler**: Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ üst köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; adı, soyadı, bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve e-mail adresi belirtilmelidir.
5. **Birinci sayfa**: Başlık, Yazarların isim ve adresleri, Araştırmayı destekleyen kuruluş, proje veya tez gibi bilgiler içermeli
6. **İkinci sayfa**: Türkçe ve İngilizce özet içermelidir.
 - ❖ **Özet**: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır.
 - ❖ Özetler, Türkçe ve İngilizce başlıkları ile birlikte tek satır aralıklarla yazılmalıdır.
7. **Anahtar kelimeler**: En fazla 5 adet olmalı ve her özletin altında alfabetik sıraya göre ve sadece baş harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır.
8. Makale **üçüncü sayfadan** itibaren GİRİŞ, MATERYAL ve METOT, BULGULAR, TARTIŞMA ve KAYNAKLAR bölümleri halinde birbirini takip etmelidir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır.
 - ❖ Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, Sonuç ve Öneriler ile Teşekkür bölümleri de eklenebilir.
 - ❖ Bölümlere ait **1. alt başlıklar** yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde paragraf hizasında yazılmalıdır (Örn; **Kimyasal Analizler**).
 - ❖ 2. ve devam eden alt başlıklarda ise **italik** ve yalnız ilk harfleri büyük harflerle yazılmalıdır (Örn; **Nitrik Oksit Tayini**)
 - ❖ Tüm başlıklar **koyu** tonda ve 12 punto ile paragraf hizasında (1 cm) yazılmalıdır. Makaleye **satır (her sayfada yeniden)** olacak şekilde ve **sayfa numaraları** (sayfa altında ve ortali) eklenmelidir.

9. Tablo ve Şekiller:

- ❖ Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde **Şekil** olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1).
- ❖ Tablo ve şekiller makale içerisinde bulunması gereken bölümlere yerleştirilmeli, başlık ve açıklamaları da Türkçe ve İngilizce olarak eklenmelidir.
- ❖ Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü **kısaltma** tablo ve şekil altında açıklanmalıdır

Birimler ve Kısaltmalar: Birimler ve ölçülerde Uluslar Arası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri **italik** olarak yazılmalıdır.

10. KAYNAKLAR- Metin içerisinde:

- ❖ Kaynak bildirimleri **tarih** sıralamasına göre yapılmalıdır. Örn; Tekinşen ve ark. (1990) olduğunu bildirmiştir veya sığırdaki glukoz seviyesiolarak belirlenmiştir (Örn; Warris, 1984; Tume ve Shaw, 1991; Tennesen ve ark., 1998; Kara ve ark., 2009). Parantez içerisinde kaynaklar yazılırken tarihi en eski olandan yeni olana doğru sıralama yapılmalıdır.
- ❖ İngilizce hazırlanan makalelerde çok yazarlı kaynaklar **et al**, iki yazarlı kaynaklar **and** ile bildirilmelidir. (Örn; Tume and Shaw, 1991; Tennesen et al.,1998; Kara et al., 2009).
- ❖ Aynı yazar ve yıla sahip kaynaklarda ayırıcı harfler kullanılmalıdır (Örn; Akbulut, 1991a, 1991b).
- ❖ Kaynak internet ortamında ise: Anonim. 2012
- ❖ **Kaynaklar Bölümünde**:
 - ❖ Kaynaklar alfabetik ve kronolojik dizin dikkate alınarak sıralanmalıdır.
 - ❖ **Kaynak makale ise**: Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect. Immun.*, 69, 4657-4660.
 - ❖ **Kaynak kitap ise**: Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., Woodhead Publ., Cambridge.
 - ❖ **Kaynak kitapta bir bölüm ise**: Mark E. 1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
 - ❖ **Kaynak bir kuruluşun yayını ise**: FAWC (1991). Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publ.
 - ❖ Kaynak bir yazılım ise: SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.
 - ❖ **Kaynak internet ortamında ise**: Anonim. 2012. Epithelial-cells, <http://www.cellapplications.com>. [Erişim: 20.03.2012].
 - ❖ Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin önerdiği uluslararası kısaltılmış şekli kullanılmalıdır.

MAKALENİN GÖNDERİLMESİ

- ❖ Makale online system (<http://e-dergi.atauni.edu.tr/index.php/VBD/index>) yada dergi e-postaları aracılığıyla gönderilecektir.
- ❖ Orijinal makale ve Tablolar.doc uzantılı olmalıdır.
- ❖ Şekiller (grafik, fotoğraf, şekiller ve resim) **JPEG** formatında **300 DPI** çözünürlükte ayrı dosya halinde gönderilmelidir.

DERGİ BASKISI

1. Baskı aşamasında olan çalışmalar en kısa sürede dergimize ait WEB alanına eklenecektir.
2. Kabul edilen çalışmalar **ücretsiz** basılacaktır.
3. Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

DERGİ ADRESİ

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 25240 , Kampüs / Erzurum / TÜRKİYE
Telefon: 0442 236 08 80, Faks: 0442 236 08 81
E-posta: atavetderg@hotmail.com; veterdergisi@atauni.edu.tr

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS OF THE JOURNAL OF VETERINARY SCIENCES OF ATATURK UNIVERSITY

1. The Journal of Veterinary Sciences of Ataturk University is a refereed scientific publication organ of Ataturk University Faculty of Veterinary Sciences and is published tri-annually in April, October and December. Abbreviation of the journal's title is "J. Vet. Sci. Ataturk University". 2. Original research papers, case reports and reviews prepared within the scope of Veterinary Medicine, livestock and nation's health are published in this journal. 3. Manuscripts to be submitted should be prepared either in Turkish or in English. 4. Manuscripts must not be published elsewhere or submitted concomitantly to any other journal. 5. Authors are responsible for complying with the copyright conditions related with the material cited (taken) from other resources or used and signing the agreement contract declaring transfer of the copyright to the journal. The full responsibility of the texts to be appeared within the journal belongs to the author(s). 6. Manuscripts to be considered are sent to the two referees at least. Acceptance of the manuscripts depends on both suggestion of the referees and final decision of the Editorial Board. 7. The statement of "Approved by the Board of Ethics" is warranted for scientific studies based on the animal experiments to be published within the Journal of Veterinary Sciences of Ataturk University. However, no such warranty is required for those manuscripts summarised from the studies of these.

MANUSCRIPT PREPARATION

1. **Manuscripts** should be written in A4-sized paper (one-sided), double-spaced, with 3 cm space from the margins of the paper and should not exceed 16 pages. They should be prepared by using Microsoft Word 6.0 or upper versions, Calibri characters with 12 point typing size. 2. **Title:** It should be written in Turkish or in foreign language along with the first letters to be in capital (β -endorphin Level in Cows) only. 3. **Name and Surname of Author(s):** Only the first letters of authors' names and surnames (without academic title) should be written in capital (Yakup KARA) and adjusted to the middle under the title. Name, surname and address of each author should be written clearly. 4. **Corresponding (responsible) author and addresses:** Corresponding author should be given along with (*) remark, a number should be added to the upper right-hand corner of the surname of authors and these numbers should be used accordingly in addresses section. For authors' addresses, name, surname, administrative body, work place, city and e-mail addresses should be given. 5. **First page:** It should contain title, authors' name-surname and addresses, funding body of the research, and details of project or thesis. 6. **Second page:** It should contain summary in Turkish and English. **Summary:** It should contain briefly the aim, material, method, results and conclusions. It should not exceed 250 words (170-200). Titles in Turkish and English should be written in single-spaced style.

7. **Key words:** They should be written 5 at maximum and alphabetic order along with the first letters to be in capital only under each abstract. 8. **Third page onwards,** the manuscript should continue with the sections of INTRODUCTION, MATERIALS and METHODS, RESULTS, DISCUSSION and REFERENCES in the following order. Section titles should be written in capital letters.

Results and Discussion may be compiled. The sections of Conclusions and Suggestions as well as Acknowledgement may also be included, as appropriate. The 1st sub-headings of the sections should be written with the first letters in capital only and aligned with the paragraph (Chemical Analyses). The 2nd and subsequent sub-headings should be written in *italic* style and their first letters should be in capital only (*Determination of Nitric Oxide*). All the headings should be written in black 12 point typing-size and aligned with the paragraph (1 cm).

9. Line (renewed on each page) and page numbers should be included within the manuscript. 10. Tables and Figures: Figures, graphics, photos and pictures within the headings and text should all be given as Figure. Figures and tables should be numbered according to their orders within the text and written without any abbreviation within the paragraph (Figure 1, Table 1). Tables and figures should be placed into the sections appropriately, and their headings and explanations should also be included in Turkish and English. All types of abbreviations (legends) used within tables and figures should be explained right under them. 11. Units and Abbreviations: For units and measurements, International Standard units (SI-system) should be used. The names of sub-species (breed) and species should be written in *italic* style. 12. REFERENCES For the text section: Reports of references should be listed in chronological order. For example, Tekinsen et al. (1990) reported that... or the level of glucose was reported as ... (Warris, 1984; Tume and Shaw, 1991; Tennessen et al., 1998; Kara et al., 2009). For manuscripts prepared in English, the references with numerous (more than two) authors should be given as et al., while those with two authors as and (Tume and Shaw, 1991; Tennessen et al., 1998; Kara et al., 2009).

For references of the identical author and publication year, separate letters should be used (Akbulut, 1991a, 1991b).

For web-based references: Anonymous. 2012. For References section: References should be listed according to alphabetical and chronological order. For manuscripts: Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect. Immun.*, 69, 4657-4660. For books: Lawrie RA., 2002. *Lawrie, Meat Science*. 6th edn., Woodhead Publ., Cambridge. For chapters of a book: Mark E.1989. Thyroid diseases. In "Textbook of Veterinary Internal Medicine", Ed., SJ Ettinger, W.B. Saunders Company, Philadelphia. For publications of a Foundation: FAWC (1991). Report on the European Commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publ. For softwares: SAS 1990. SAS User's Guide: Statistics, 4th edn., SAS Institute, Cary. For web-based references: Anonymous. 2012. Epithelial-cells, <http://www.cellapplications.com>. [Reached: 20.03.2012]. For writing the journal titles of the references cited, their short versions, as suggested by the journal concerned and recognized internationally, should be used.

SENDING MANUSCRIPTS

For sending the manuscripts by on line system <http://e-dergi.atauni.edu.tr/index.php/VBD/index> or e-mail

Original manuscript and Tables *.doc extension, Figures (graphs, photos, figures) should be sent in JPEG format with 300 DPI resolution, as a separate file.

JOURNAL PUBLICATION

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For those manuscripts presently in press, a pdf file will be added at the journal's address on the web. For those manuscripts pressed already, separate copies won't be sent to the authors.

JOURNAL'S ADDRESS

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, 25240, Yakutiye-ERZURUM (TR)
Phone: +90 (442) 2360880, Fax: +90 (442) 2360881
E-mail: atavetderg@hotmail.com; vetdergisi@atauni.edu.tr

TELİF HAKKI DEVİR FORMU

Aşağıda imzaları bulunan (Yazarların adı-soyadı)
..... tarafından
yazılmış (Makale adı)
..... adlı makalenin
orijinal olduğu, kısmen veya tamamen daha önceden yayınlanmadığı veya yayınlanmak üzere başka yayın
kuruluşuna gönderilmediği; danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her
türlü yayın hakkını, yazının yayınlandığı tarihten itibaren Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne
devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bütün yazarlar tarafından imzalanmak üzere

<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>	<u>Tarih</u>
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Sorumlu Yazar:

Adı ve Soyadı:

Adres:.....

Telefon:.....

Fax:

E- mail:.....

Tarih:..... **İmza:**.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra, e-mail adreslerimizden herhangi birine makaleyle birlikte gönderiniz.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
25240-Erzurum
Telefon: (0442) 236 08 80
Faks: (0442) 236 08 81
E-mail: vetdergisi@atauni.edu.tr
atavetderg@hotmail.com

COPYRIGHT RELEASE FORM

All authors (Name and surnames)
.....
.....of the manuscript titled
.....

.. is original\ has not been partially or totally published nor has it already been sent to any other journal.
After being revised by referees or editor and published, we agreed that all copyright is reserved by Ataturk
Universty journal of Vetarinary science.

Signatures

<u>Name and surname</u>	<u>Signature</u>	<u>Date</u>
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Correspondence Author:

Name and surname:

Address:.....

Phone:.....

Fax:

E- mail:.....

Date..... **Signature:**.....

Note: Send the e-mail and form after filled and signed to the address below.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü
Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi
25240, Kampus-ERZURUM (TR)
Phone: +90 (442) 2360880
Fax: +90 (442) 2360881
E-mail: atavetderg@hotmail.com
vetdergisi@atauni.edu.tr

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Sayfa /
Page

Araştırma Makaleleri / Research Articles

- ▶ **Hatice Mahur TURAN, Emre ÖZAN, Harun ALBAYRAK, Abdullah CAVUNT, Yavuz Selim MEMİŞ.** Efficiency of Three PPRV Vaccines Commercially Available in Turkey (*Türkiye`de Ticari Olarak Kullanılan Üç Farklı PPRV Aşısının Etkinliği*) 1-6
- ▶ **Yıldıray KALKAN, Levent TÜMKAYA, Habib BOSTAN, Yakup TOMAK, Durdu ALTUNER, Orhan BAŞ, Orhan Ünal ZORBA, Hakkı UZUN.** Yetişkin Sıçanlarda Testis Hücreleri ve Kalsinörin Immunopozitifliği Üzerine Ketaminin Etkileri: Bir Immunohistokimyasal ve Histopatolojik Çalışma (*Effects on Calcineurin Immunopositivity and Testes Cells of Ketamine in Adult Rat: An Immunohistochemistry and Histopathological Study*). 7-17
- ▶ **Mehmet AYDIN, Uğur Yücel KESİCİ.** Ülkemizdeki Deniz Memelileri Gösteri Merkezlerinin Durumu (*Present Condition of Marine Mammals Show Centers of Turkey*). 19-25
- ▶ **Emre OZAN, Hatice Mahur TURAN, Harun ALBAYRAK, Abdullah CAVUNT.** Serological Determination of Pestivirus, Bluetongue Virus and Peste Des Petits Ruminants Virus in Small Ruminants in Samsun Province of Turkey (*Samsun İlindeki Küçük Ruminantlarda Pestivirus, Mavidil Virusu ve Küçük Ruminant Vebası Virusunun Serolojik Olarak Belirlenmesi*). 27-33
- ▶ **Azime DOĞRUER, Erdal ÖZMEN.** Kıvrıcık Koyunlarında Koroner Arterler Üzerine Makroanatomik Bir Çalışma (*A Macroanatomical Study on the Coronary Arteries of Kıvrıcık Sheep*). 35-45
- ▶ **Hurrem Turan AKKOYUN, Nursel DOSTBİL.** Doğal Ortamlardan İzole Edilen Alkalifilik Toprak Bakterilerinde Plasmid Kodlu Na-Tellurit Dirençliliği ve Transformasyon Olanaklarının Araştırılması (*Investigations upon the Likelihood of Transformation and Resistance of Na-Tellurite Originated Plasmide at the Soil Bacteria Isolated from Natural Environment*). 47-52
- ▶ **Ahmet TOPAL, Fikret ÇELEBİ.** Hiperisin'in İzole Edilmiş Sıçan Midesinde Mide Asit Sekresyonu Üzerine Etkisi (*Effects of Hypericin on Gastric Acid Secretion in Isolated Rat Stomach*).**Düzeltilme** 53-54

Olgu Sunumu / Case Report

- ▶ **Hayrettin ÇETİN, Ömer KORKMAZ, Mehmet Osman ATLI.** Bir Koyunda Sekonder Abdominal Gebelik (*Secondary Abdominal Pregnancy in an Ewe*). 55-58

Derlemeler / Reviews

- ▶ **Ahmet Kürşat AZKUR, Muhammet Eren ASLAN.** Akış Sitometri ve Veteriner Hekimlikteki Uygulamaları (*Flow Cytometry and its Applications for Veterinary Medicine*) 59-66
- ▶ **Mehmet Osman ATLI, Mehmet KÖSE, Ercan KURAR, Aydın GÜZELOĞLU, Ahmet SEMACAN.** Kısırlarlarda Erken Gebelik Tespiti (*Early Detection of Pregnancy in Mares*). 67-75