

ISSN 2146-717X  
e-ISSN 2146-7188

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

*Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine*



*Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty of Veterinary Medicine*

YIL/YEAR: 2017 CİLT/VOLUME: 6 SAYI/ISSUE: 1

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of The Faculty of Veterinary Medicine



Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınıdır  
Published by Harran University Faculty Of Veterinary Medicine

YIL/YEAR:2017

CİLT/VOLUME:6

SAYI/ISSUE:1

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi Hakemli**

**Bir Dergi Olup;**

**- TÜBİTAK ULAKBİM Yaşam Bilimleri Veri Tabanı**

**- Türkiye Atıf Dizini tarafından taranan dergi grubundadır.**

**Baskı: Elif Matbaası**

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

Harran University  
Journal of the Faculty of Veterinary Medicine

**Harran Üniversitesi**  
**Veteriner Fakültesi Adına**  
**Sahibi/Owner**  
Prof. Dr. Mehmet AVCI  
**Dekan/Dean**

**Editör/Editor**  
Prof. Dr. Nihat DENEK

**Editör Yardımcıları/Assoc. Editors**  
Doç. Dr. Bestami YILMAZ

**Yayın Kurulu/Editorial Board**  
Prof. Dr. Murat SEVGİLİ  
Prof. Dr. Ali HAYAT  
Doç. Dr. Osman Yaşar TEL  
Doç. Dr. Faruk BOZKAYA  
Yrd. Doç. Dr. İrfan ÖZGÜNLÜK  
Yrd. Doç. Dr. Birten EMRE  
Yrd. Doç. Dr. Nihat YUMUŞAK  
Yrd. Doç. Dr. Serap KILIÇ ALTUN

**Yazışma /Correspondence**  
Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dergisi Editörlüğü Eyyübiye Kampüsü,  
63200 - Şanlıurfa/TÜRKİYE  
Tel: +90 414 318 38 59  
+90 414 318 38 55  
Faks: +90 414 318 39 22  
e-mail: harranvet@gmail.com

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Dergisi Hakemli Bir Dergi Olup, Yılda 2(iki)  
Sayı Olarak Yayınlanır.  
Yıl/Year: 2017 - Cilt/Volume: 6 - Sayı/Issue: 1

## Danışma Kurulu/Advisory Board

Prof. Dr. Ergun AKÇAY, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Atatürk Üniv. Vet. Fak. Erzurum, Türkiye.  
Prof. Dr. Halil Selçuk BİRİCİK, Aksaray Üniv. Vet. Fak. Aksaray, Türkiye  
Prof. Dr. Ali BUMİN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Hayrettin ÇETİN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın Türkiye.  
Prof. Dr. Hasan EREN, Adnan Menderes Üniv. Vet. Fak. Aydın, Türkiye.  
Prof. Dr. Okan ERTUĞRUL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Anila HODA, Agric. Uni. of Tirana, Fac. of Agric.& Environ. Tirana,  
Albania.  
Prof. Dr. Osman KUTSAL, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Narin LİMAN, Erciyes Üniv. Vet. Fak. Kayseri, Türkiye.  
Prof. Dr. Manzoor Ur Rahman MIR, SKUAST Kashmir Fac. of Vet. Sci. &  
Anim. Husbandry. Kashmir, India.  
Prof. Dr. Sema TEMİZER OZAN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Ceyhan ÖZBEYAZ, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Gerald REINER, Justus-Liebig Uni. Fac. of Vet. Med. Giessen,  
Germany.  
Prof. Dr. Kazım ŞAHİN, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Atilla ŞİMŞEK, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Mehmet Emin TEKİN, Selçuk Üniv. Vet. Fak. Konya, Türkiye.  
Prof. Dr. Ender YARSAN, Ankara Üniv. Vet. Fak. Ankara, Türkiye.  
Prof. Dr. Halis YERLİKAYA, Fırat Üniv. Vet. Fak. Elazığ, Türkiye.  
Prof. Dr. Murat YILDIRIM, Kırıkkale Üniv. Vet. Fak. Kırıkkale, Türkiye.

**Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**2017 Yılı 6. Cilt 1. Sayı Hakem Listesi (alfabetik sıra)**  
***The Referees List of This Issue (in alphabetical order)***

Emel ALAN	<i>Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Semih ALTAN	<i>Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Serap KILIÇ ALTUN	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Vahdettin ALTUNOK	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mustafa ARICAN	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Ayhan ATA	<i>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mustafa ATASEVER	<i>Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Emine BAYDAN	<i>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Ali BAYRAKDAR	<i>Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Nuriye Tuğba BİNGÖL	<i>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Oya BULUT	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Zafer BULUT	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Serhat BÜYÜKLEBLEBİCİ	<i>Mersin Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu</i>
Güzin ÇAMKERTEN	<i>Aksaray Üniversitesi Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu</i>
Hasan ÇİÇEK	<i>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
İbrahim DEMİRKAN	<i>Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Burak DİK	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Hikmet DİNÇ	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Birten EMRE	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Güneş ERDOĞAN	<i>Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Ali ERTEKİN	<i>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Semra GÜRBÜZ	<i>Mardin Artuklu Üniversitesi Turizm İşletmeciliği ve Otelcilik Yüksekokulu</i>
Ali HAYAT	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
R.Merih HAZIROĞLU	<i>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Özmen İSTEK	<i>Muş Alparslan Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu</i>
Cafer Tayer İŞLER	<i>Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Kanber KARA	<i>Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mehmet Çağrı KARAKURUM	<i>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Zeynep KARAPINAR	<i>Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mehmet Önder KARAYİĞİT	<i>Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mehmet Akif KARSLI	<i>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Oktay KESKİN	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Ali Haydar KIRMIZIGÜL	<i>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mushap KURU	<i>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Melek KOÇAK	<i>Namık Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Lora KOENHEMSİ	<i>İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Cevat NİSBET	<i>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Özcan ÖZGEL	<i>Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Şule Yurdagül ÖZSOY	<i>Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Caner ÖZTÜRK	<i>Aksaray Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Engin SAKARYA	<i>Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Mustafa SALMAN	<i>Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Sezgin ŞENTÜRK	<i>Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Nihat ŞINDAK	<i>Siirt Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Kasım TAKIM	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Ömer VARIŞLI	<i>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
İlknur PİR YAĞCI	<i>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Orhan YAPICI	<i>Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Rahşan YILMAZ	<i>Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>
Volkan YILMAZ	<i>Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi</i>

**Harran Üniversitesi**  
**Veteriner Fakültesi Dergisi**  
**Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine**  
**2017 Yılı 6. Cilt 1. Sayı**

**İçindekiler / Contents**

**Araştırma Makaleleri / Research Articles**

**Sayfa / Page**

1. **Diyetsel Zeolitin, Japon Bildircinlerinde Besi Performansı ve Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi**  
Dietary Zeolite, Fattening Performance and its Effect on Some Biochemical Parameters in Japanese Quail  
**Mehmet Hanifi DURAK, Tahir BAYRIL, Aynur ŞİMŞEK, İlyas ALAK, Esra GÖKALP, Sema GÜRGÖZE** 1-5
2. **Kliniğimize Gelen Koyun ve Keçi Dystocia Olgularının Değerlendirilmesi: Etiyoloji, Klinik Yaklaşım ve Sonuçlar**  
Evaluation of Sheep and Goat Dystocia Cases Submitted to Our Clinic: Etiology, Clinical Approach and Results  
**Ömer KORKMAZ, Hayrettin ÇETİN, Mehmet Osman ATLI, Abuzer Kafar ZONTURLU** 6-10
3. **Ratlarda Parasetamol ile Oluşturulan Hepatotoksisite Üzerine *Taraxacum officinale* Etanol Ekstraktının Etkisi**  
The Effect of *Taraxacum officinale* Ethanol Extract on Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Rats  
**Esra AKTAŞ ŞENOCAK, Betül APAYDIN YILDIRIM** 11-18
4. **Sığırlarda Ahır Zemin Tiplerinin Ayak Hastalıkları ve Tırnak Deformasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması**  
Investigation of Cattle in the Diseases of Stable Ground Foot Type and Nail on the Effects of Deformation  
**Mehmet Cengiz HAN, Aydın SAĞLIYAN, Eren POLAT** 19-24
5. **Kısırlaştırılan Kedilerde Krom Pikolinatın Ağırlık Artışı, Morfometrik Ölçümler ile Kan Lipid ve Leptin Seviyelerine Etkisi**  
Effects of Chromium Picolinate on Weight Gain, Morphometric Measurements and, Blood Lipid and Leptin Levels in Gonadectomized Cats  
**Öznur ASLAN, Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ, Fatma UYANIK, Yücel ÇAM, Kazım GÜVENÇ, Kutlay GÜRBULAK** 25-31
6. **Detection of *Listeria monocytogenes* in Fried Fish, Processing Slab and Tools in Kwara State, Nigeria**  
Nijerya'nın Kwara Eyaletinde Tüketime Sunulan Kızartılmış Balıklar ile Bu Amaçla Kullanılan İşleme Levhası ve Aletlerde *Listeria monocytogenes* Varlığının Belirlenmesi  
**İbrahim ADESHINA, Mozeedah ABDULWAHAB, Yusuf Adetunji ADEWALE, Sa'adu Bala SULEIMAN, Lateef Oloyede TIAMIYU** 32-37
7. **Kırşehir İli Merkez İlçede Sığır Besiciliği Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi**  
Economic Analysis of Cattle Fattening Enterprises in the Centre of Kırşehir Province  
**Coşkun ÇELİK, Savaş SARIÖZKAN** 38-45
8. **Laktasyondaki İneklerde Tohumlama Anında Azaltılan GnRH Dozunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi**  
The Effect of Reduced Dose of GnRH Administered at the Time of Insemination on Pregnancy Rate in Lactating Dairy Cows  
**Ramazan SERTKOL, Mustafa Kemal SARIBAY** 46-50
9. **A Comparison of the Performance of Exfoliative Cytopathology, Polymerase Chain Reaction (PCR), Culture and ELISA in the Detection of *Brucella canis***  
*Brucella canis*'in Tanısında Eksfoliyatif Sitopatoloji Verilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Kültür ve ELISA Yöntemleri ile Karşılaştırılması  
**Nihat YUMUSAK, Pelin Fatos POLAT, Sevil ERDENLİG GURBILEK, Cigdem CEBİ SEN, Rahsan YILMAZ** 51-56

10. **GAP Bölgesi'nde Pestisit Satış Yerlerinde Çalışanlarda Kolinesteraz İnhibitörleri ve Karaciğer Enzim Düzeylerinin İncelenmesi**  
Investigation of Cholinesterase Inhibitors and Liver Enzyme Levels in Pesticide Dealer Workers of GAP Region  
**Fatma MUTLU, Zeynep ŞİMŞEK, Mehmet CİCİ** 57-62
11. **Aydın ve İzmir İllerindeki Koyun ve Keçilerde Pestivirus Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması**  
A Serological and Virological Investigation of the Pestivirus Infections in Sheep and Goats in the Aydın and İzmir Provinces  
**Zafer Emin URAL, Nural EROL** 63-68
12. **Köpekte Beynin 3 Tesla Manyetik Rezonans ile 3 Boyutlu Multiplanar Rekonstruksiyonu**  
3 Dimensional Multiplanar Reconstruction of the Brain at 3 Tesla Magnetic Resonance in Dog  
**Çağdaş OTO** 69-72
13. **Sığırlarda Oküler ve Perioküler Tümörlerin Klinik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi**  
Clinical and Histopathological Evaluation of Bovine Ocular and Periocular Tumors  
**Ünal YAVUZ, Nihat YUMUŞAK** 73-78
14. **Koç Spermalarının Dondurulmasında Bireysel Farklılıkların Etkisi**  
Response to Different Semen Extenders of Individual Ram Semen  
**Çiğdem ÇEBİ ŞEN, Recai KULAKSIZ, Ali DAŞKIN, Ergun AKÇAY** 79-83
15. **Effect of Adding Different Levels of Dried Molasses Sugar Beet Pulp on the Silage Quality and *In Vitro* Digestibility of Wet Tomato Pomace Silage**  
Yaş Domates Posasına Farklı Düzeylerde Melaslı Kuru Şeker Pancarı Posası İlavesinin Silaj Kalitesi ile *In Vitro* Sindirim Üzerine Etkisinin Araştırılması  
**Halim Gökhan SARGIN, Nihat DENEK** 84-89
16. **Güvercinde (*Columbidae columbiformes*) Pekten Okulinin Histomorfolojik Yapısı**  
Histomorphological Structure of Pecten Oculi in Pigeons (*Columbidae columbiformes*)  
**Deniz KORKMAZ** 90-94

### **Olgu Sunumu / Case Report**

17. **Simental Irkı Bir Buzağıda Çoklu Ürogenital Sistem Anomalisi**  
Multi Urogenital System Anomalies in a Simmental Calf  
**Sadık YAYLA, Engin KILIÇ, Hasan ÖZEN, Vedat BARAN, Uğur AYDIN, Emin KARAKURT** 95-98
18. **Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment in a Dog with Heavily Injured Tail due to Tail Chasing Behavior**  
Bir Köpekte Kuyruk Yakalama Davranışına Bağlı Olarak Oluşan Kuyruk Yaralanmasında Trombositçe Zengin Plazma (TZP) Uygulaması  
**Duygu DALĞIN, Yücel MERAL, Taylan ÖNYAY, Metin ÇENESİZ** 99-101

### **Derlemeler / Reviews**

19. **Nöroprotektif Etkili Bir Flavonoid: Nobiletin**  
A Flavonoid has Neuroprotective Effect: Nobiletin  
**Gül Fatma YARIM, Metin ÇENESİZ, Murat YARIM, Sena ÇENESİZ, Filiz KAZAK** 102-107
20. **Viral Enfeksiyonlarda Telomeraz Aktivitesi**  
Telomerase Activity in Viral Infections  
**Elif BAYRAM, Metin ÇENESİZ, Semra OKUR GÜMÜŞOVA** 108-111
21. **In Vitro Sitotoksitesite Testleri**  
In Vitro Cytotoxicity Assays  
**Orhan TOKUR, Abdurrahman AKSOY** 112-118

## Diyetsel Zeolitin, Japon Bildircinlarında Besi Performansı ve Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi

Mehmet Hanifi DURAK<sup>1\*</sup>, Tahir BAYRIL<sup>2</sup>, Aynur ŞİMŞEK<sup>3</sup>, İlyas ALAK<sup>1</sup>, Esra GÖKALP<sup>4</sup>, Sema GÜRGÖZE<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>2</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>3</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

<sup>4</sup>Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Şanlıurfa Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 28.07.2016

Kabul Tarihi: 23.09.2016

**Özet:** Bu araştırma rasyona %2.5 ve %5 oranında zeolit ilavesinin Japon bildircinlarında canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı ile bazı kan biyokimya parametreleri ve element konsantrasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı. Araştırmada toplam 90 adet bir haftalık Japon bildircin civcivi (*Coturnix coturnix japonica*) kullanıldı. Her birinde 30'ar hayvan bulunan bir kontrol ve iki deneme grubu düzenlendi. Araştırma 42 gün devam etti. Araştırma sonunda rasyona zeolit ilavesi bildircinlarda canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranında gruplar arasında istatistiksel bir fark oluşturmadı. Sonuçlar, %2.5 ve %5 zeolit gruplarında kan Ca ve Mg (P<0.001) düzeylerinin, %5 zeolit grubunda alanin aminotransferaz (P<0.01) ve P (P<0.05) düzeylerinin, %2.5 zeolit grubunda ise albümin (P<0.001) düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını gösterdi. Ancak %5 zeolit içeren diyetle beslenenlerde glukoz (P<0.01), total protein (P<0.05) ve aspartat aminotransferaz (P<0.05) düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azaldı. Zeolit katkısı serum alkalın fosfataz, üre, kreatinin, direkt bilirubin, total bilirubin ve Fe düzeylerini etkilemedi. Elde edilen sonuçlar, zeolit ilavesinin albümin, Ca, Mg, P, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, glukoz ve total protein hariç, araştırılan parametrelerin serum konsantrasyonları üzerine pozitif bir etkisinin olmadığını, ancak hayvan sağlığı üzerine de negatif bir etki oluşturmadığını gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** Canlı ağırlık artışı, Bildircin, Biyokimya parametreleri, Rasyon, Yemden yararlanma, Zeolit.

### Dietary Zeolite, Fattening Performance and its Effect on Some Biochemical Parameters in Japanese Quail

**Abstract:** This study was conducted to determine the effects of rations containing 2.5% and 5% zeolite on the live weight gain, feed conversion efficiency, feed consumption and some blood biochemical parameters and elements concentrations in Japanese quails. In this experiment a total of 90 one week old Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*) were used. They were allocated in to one control group and two treatment groups each containing 30 quail chicks. The experiment was continued for 42 days. Zeolite administration didn't affect live weight gain, feed consumption and feed efficiency. The results showed that blood Ca and Mg (P<0.001) levels in groups containing 2.5%, 5% zeolite, alanin aminotransferaz (P<0.01), P (P<0.05) in group inclusion 5% zeolite and albumin (P<0.001) in group inclusion 2.5% zeolite significantly increased compared to the control. However, glucose (P<0.01), total protein levels (P<0.05) and aspartat aminotransferaz (P<0.05) activity in diet containing 5% zeolite significantly decreased when compared to control. Zeolite administration did not affect serum alkalın fosfataz, urea, creatinine, direct bilirubin, total bilirubin and Fe levels. The results showed that the supplementation of zeolite did not have positive effect on serum concentrations of the investigated parameters apart from albumin, Ca, Mg, P, aspartat aminotransferaz, alanin aminotransferaz, glucose and total protein but they had no negative effect on the health status of animals.

**Keywords:** Live weight gain, Quail, Biochemistry parameters, Ration, Feed efficiency, Zeolite.

### Giriş

Zeolitler, (Clinoptilolit) su molekülleri içeren gözenekli yapıya sahip alüminyum, silika ya da oksijen atomlarından yapılmış, üç boyutlu kristal yapılı doğal ya da sentetik hidratlanmış alüminyum silikatlardır (Öztürk ve ark., 1998). Son yıllarda clinoptilolit toksin bağlayıcı, kötü koku giderici, performans artırıcı, yumurta kabuk kalitesini iyileştirici etkilerinin olduğu ileri sürülmektedir

(Demirel ve ark., 2010). Doğal zeolit mineralleri içinde alkali ve toprak alkali katyonlardan Na, K, Ca ve Mg gibi elementleri içeren clinoptilolit türü, lifsi olmayan mineral yapısı, zararlı elementler içermemesi ve kalitesinin yüksekliği nedeniyle organik hayvancılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır (Çelebi ve ark., 2004). Bazı araştırmacılar (Parlat ve ark., 1999; Rizzi ve ark., 2003; Oğuz ve ark., 2000)



kümes hayvanlarında rasyona zeolit ilavesinin besi performansı üzerine olumlu etkilerini rapor etmişlerdir. Papaioannou ve ark. (2004), zeolit ilavesinin hayvanların canlı ağırlık artışı, sağlık durumu ve bağışıklık sistemi üzerine olumlu etkilerinin olduğunu ve antibiyotiğe olan ihtiyaçlarının azaldığını bildirmişlerdir. Yumurta tavuğu yemlerine zeolit katkısının yumurta verim ve kabuk kalitesinde iyileşmeye neden olduğu, dışkılarındaki bakteri yoğunluğunun azalmasıyla da hastalıklarda gerileme olduğu yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur (Nikolakakis ve ark., 2013). Yapılan literatür incelemelerinde, Japon bildırcınlarında yeme zeolit katılması ile ilgili çalışmaların yetersiz olması çalışmamızın ana fikrini oluşturmuştur.

Bu araştırma, Japon bildırcınlarının rasyonlarına farklı oranlarda ticari adı zeolit olan clinoptilolit yapısındaki doğal zeolit ilavesinin canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı ile bazı kan biyokimya parametreleri ve

element konsantrasyonları üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

## Materyal ve Metot

Araştırmada kullanılan toplam 90 adet bir haftalık Japon bildırcın civcivi (*Coturnix coturnix japonica*) ticari bir üretim çiftliğinden satın alındı. Bildırcınlar her birinde 30'ar hayvan bulunan bir kontrol ve iki deneme grubu olmak üzere üç gruba ayrıldı. Araştırma 42 gün boyunca devam etti. Bildırcınlar ilk günlerde ısı kontrollü odada, 37 °C'de, tel kafeslerde barındırıldı. Oda ısısı üçüncü haftanın sonunda tedrici olarak 22 °C'ye azaltıldı ve sonra sabit tutuldu. Bildırcınlar 42 günlük periyot boyunca 1) bazal diyet, 2) bazal diyet + %2.5 zeolit ve 3) bazal diyet + %5 zeolit olmak üzere üç tip diyetle beslendi. Deneyde kullanılan diyetin içeriği ve kimyasal kompozisyonu Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** Deneme rasyonunun besin madde miktarı ve kimyasal içerikleri

Bileşenler	Başlangıç fazı (1–21gün) (%)	Büyüme fazı (22–42 gün) (%)
Mısır	54.2	57.35
Soya fasulyesi küsbesi	35.4	28.21
Soya yağ	6	3.53
Kireç taşı	1.7	8.42
Dikalsiyum fosfat	1.6	1.69
Sodyum klorit	0.4	0.30
Vitamin-mineral premix <sup>a</sup>	0.5	0.35
DL-Methionine	0.2	0.15
<b>Kimyasal analiz, kuru madde, %.</b>		
Ham protein	21.7	19.8
Ham yağ	4.73	4.15
Ham selüloz	3.74	3.72
Kalsiyum	1.0	0.9
Fosfor	0.76	0.72
<b>Hesaplanmış bileşim<sup>b</sup></b>		
Metabolik Enerji, MJ/kg	12.91	12.91
Lizin	1.14	1.08
Metiyonin + sistein	0.89	0.64

<sup>a</sup>Vitamin ön karışım her 1 kg'da: retinol asetat 1.8 mg; kolekalsiferol 0.025 mg; tokoferol asetat 1.25 mg; menadion (menadion sodyum bisülfid) 1.1 mg; riboflavin 4.4 mg; tiyamin (tiyamin mononitrat) 1.1 mg; piridoksin 2.2 mg; niasin 35 mg; Ca-pantotenat 10 mg; vitamin B12 0.02 mg; folik asit 0.55 mg; d-biyotin 0.1 mg içermektedir.

Mineral ön karışım 1 kg' da: Mn ( MnO) 40 mg; Fe ( FeSO4) 12.5 mg; Zn (ZnO) 25 mg; Cu (CuSO4) 3.5 mg; I (KI) 0.3 mg; Se (NaSe) 0.15 mg; kolin klorid 175 mg içermektedir.

<sup>b</sup> Hesaplama ile bulunmuştur (Jurgens, 1996).

Su ve yem serbest olarak verilirken, günlük toplam aydınlatma süresi 14 saat aydınlık ve 10 saat karanlık olarak ayarlandı. Deney sonunda her bir gruptan 10 bildırcın rastgele seçildi. Kesim öncesi kuşlar bireysel olarak tartıldı ve her bir kuşun kanat veninden 2 ml kan alındı. Kan örnekleri hemen 3000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve serumlar analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı. Serum

örneklerinde, albumin (ALB), üre, kreatinin (CRE), direkt bilirubin (DBL), total bilirubin (TBL), total protein (TP), glukoz (GLU), alkalın fosfataz (ALP), aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), Ca, Fe, Mg ve P düzeyleri otoanalizörde ticari kitler kullanılarak ölçüldü. İstatistiksel analizlerde SPSS 11.5 paket programından yararlanıldı. Uygun analiz türünün

belirlenmesi amacıyla, verilerin normal dağılıma sahip olup olmadıklarının tespitinde Kolmogorov Smirnov Testi, varyansın homojenitesi için Oneway Anova Testi (Homogeneity of variance test seçeneği ile) kullanıldı. Verilerin parametrik test varsayımlarını karşılamasından dolayı gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmada önemlilik tespitinde Duncan testi (Duncan, 1955) kullanıldı, önemlilik düzeyi  $P < 0.05$  olarak alındı.

## Bulgular

Bıldırıcın rasyonuna ilave edilen zeolitin performans üzerine etkileri Tablo 2'de verildi. Tablo 2 incelendiğinde zeolitin kesim ağırlığı, canlı ağırlık

artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı görüldü ( $P < 0.05$ ). Gruplarda deneme sonu belirlenen serum ALB, üre, CRE, DBL, TBL, TP, GLU, ALP, AST, ALT, Ca, Fe, Mg ve P düzeyleri tablo 3'de gösterildi. Sonuçlar, %2.5 ve %5 zeolit gruplarında kan Ca ve Mg ( $P < 0.001$ ) düzeylerinin, %5 zeolit grubunda ALT ( $P < 0.01$ ) ve P ( $P < 0.05$ ) düzeylerinin, %2.5 zeolit grubunda ise ALB ( $P < 0.001$ ) düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığını gösterdi. Ancak %5 zeolit içeren diyetle beslenenlerde GLU ( $P < 0.01$ ), TP ve AST ( $P < 0.05$ ) düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azaldı. Zeolit katkısı serum ALP, üre, CRE, DBL, TBL ve Fe düzeylerini etkilemedi.

**Tablo 2.** Bıldırıcın rasyonlarına ilave edilen zeolitin performans üzerine etkileri<sup>a</sup>

Veriler	Zeolit, %			SEM	İstatistiksel Anlamlılık, $P > F^b$		
	Kontrol	2.5	5		S	L	K
Kesim ağırlığı, g <sup>c</sup>	196.6	178.0	190.0	6.628	0.174	0.504	0.081
Canlı ağırlık artışı, g	165.9	157.3	162.8	6.318	0.122	0.745	0.544
Yem tüketimi, g	819.0	823.6	801.8	67.51	0.971	0.858	0.872
YYO <sup>d</sup>	4.94	5.24	4.93	0.454	0.617	0.830	0.342

<sup>a</sup>Veriler LSD ve SEM olarak sunulmuştur. <sup>b</sup>İstatistiksel karşılık: S= Zeolitin etkisi; L= Lineer etki; K= Kuadratik etki. <sup>c</sup>n= 10 bıldırıcın. <sup>d</sup>Yemden yararlanma oranı= 1 g canlı ağırlık artışı için tüketilen yem miktarı, g.

**Tablo 3.** Deneme gruplarına ait serum biyokimyasal parametreler ( $x \pm SE$ )

Parametre	Gruplar		
	Kontrol (n=10)	Zeolit %2.5 (n=10)	Zeolit %5 (n=10)
ALB (g/dl)	1.23 $\pm$ 0.06 <sup>a,3</sup>	1.60 $\pm$ 0.03 <sup>b,3</sup>	1.28 $\pm$ 0.04 <sup>a,c,3</sup>
ÜRE (mg/dl)	4.45 $\pm$ 0.30	4.92 $\pm$ 0.36	5.03 $\pm$ 0.41
CRE (mg/dl)	0.06 $\pm$ 0.03	0.07 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.02
DBL (mg/dl)	3.70 $\pm$ 0.33	3.53 $\pm$ 0.40	3.08 $\pm$ 0.23
TBL (mg/dl)	2.57 $\pm$ 0.38	2.48 $\pm$ 0.25	1.83 $\pm$ 0.14
TP (g/dl)	8.34 $\pm$ 0.3 <sup>a,1</sup>	8.07 $\pm$ 0.3	7.44 $\pm$ 0.1 <sup>b,1</sup>
GLU (mg/dl)	152 $\pm$ 2.9 <sup>a,2</sup>	168 $\pm$ 7.9 <sup>a,c,3</sup>	128 $\pm$ 2.9 <sup>b,2,3</sup>
ALP (IU/L)	1127 $\pm$ 55.9	1136 $\pm$ 67.9	985 $\pm$ 69.4
AST (U/L)	263 $\pm$ 13.4 <sup>a,1</sup>	234 $\pm$ 8.68	221 $\pm$ 11.5 <sup>b,1</sup>
ALT (IU/L)	9.1 $\pm$ 0.70 <sup>a,2</sup>	12.9 $\pm$ 1.16	15.8 $\pm$ 1.50 <sup>b,2</sup>
Ca (mg/dl)	8.5 $\pm$ 0.3 <sup>a,2,3</sup>	12.4 $\pm$ 0.7 <sup>b,3</sup>	11.2 $\pm$ 0.4 <sup>bc,2</sup>
Fe (mg/dl)	130 $\pm$ 4.45	111 $\pm$ 7.27	125.4 $\pm$ 7.46
Mg (mg/dl)	3.26 $\pm$ 0.2 <sup>a,2,3</sup>	5.94 $\pm$ 0.5 <sup>b,3</sup>	5.33 $\pm$ 0.4 <sup>bc,2</sup>
P (mg/dl)	4.40 $\pm$ 0.35 <sup>a,1</sup>	5.47 $\pm$ 0.78	6.31 $\pm$ 0.27 <sup>b,1</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler istatistiksel olarak farklıdır. <sup>1,2,3</sup>: Satırlarda aynı rakamı taşıyan gruplar arasındaki istatistiksel önemlilik derecesi sırasıyla  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$

## Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmada, rasyona zeolit ilavesinin bıldırıcınlarda kesim ağırlığı, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı üzerine gruplar arasında herhangi bir istatistiksel fark oluşturmadığı bulundu. Tufan ve ark. (2014) bıldırıcınlarda yaptıkları çalışmalarda zeolit ilavesinin canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı üzerine herhangi bir

etkisinin olmadığını, aksine %6 oranında zeolit ilave edilen deneme grubundaki kesim ağırlığının kontrol grubuna göre sayısal olarak daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular bizim yaptığımız çalışma ile benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde bazı araştırmacılar broyler rasyonlarına %1, 2, 3 ve 5 oranında zeolit ilavesinin kesim ağırlığını değiştirmediklerini belirtmişlerdir (Eleroğlu ve ark.,

2011; Ouhida ve ark., 2000). Bu sonuçlardan farklı olarak broyler rasyonlarına %0.5, 1 ve 2 düzeyinde sepiyolit (doğal kil minerali) ilave edilmesinin canlı ağırlığı artırdığını bildiren bazı araştırmacılar mevcuttur (Ayed ve ark., 2008; Eser ve ark., 2012). Bu araştırma sonucu ile bazı araştırmacıların bildirdiği sonuçlar arasındaki farklılıklar kullanılan zeolit türevlerinden, miktarlarından, kullanılan rasyonun enerji ve besin madde içeriğinden kaynaklanmış olabilir.

Safaeikatouli ve ark. (2011) piliçlerde diyetle zeolit ilavesinin globülin, üre ve CRE düzeylerinde istatistikî açıdan önemli bir fark oluşturmadığını, TP, TBL ve ALB düzeylerinde ise artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir. Alexopoulos ve ark. (2007) domuzlarda yapmış oldukları bir çalışmada diyetle zeolit ilavesinin, kan üre düzeylerinde azalmalara neden olduğunu, Vrzgula ve Bartko (1984), zeolit katkısının domuzlarda serum TBL konsantrasyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmadığını saptamışlardır. Bu çalışmada, %5 zeolit içeren diyetle beslenen bıldırcınlarda TP (P<0.05) düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azaldı. Zeolit katkısı, bıldırcınlarda ALB düzeylerini artırırken; üre, CRE, DBL ve TBL düzeylerini etkilememiştir.

Safaeikatouli ve ark. (2011)'nin yapmış oldukları çalışmada, zeolit katkılı diyetle beslenen piliçlerde, serum ALP ve ALT aktivitesinin kontrol grubuna göre nispeten yüksek çıktığını, ancak, bu durumun yine de referans değerler arasında kaldığını bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar sadece 30 g/kg düzeylerinde zeolit eklenen diyetle beslenen hayvanlarda, AST düzeylerinde önemli derecede azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Bir kısım yazarlar, domuzlarda diyetle zeolit ilavesinin serum AST ve ALT aktiviteleri üzerine herhangi bir etki oluşturmadığını bildirirken (Alexopoulos ve ark., 2007), aksine bazı yazarlar diyetle zeolit katkısının domuzlarda AST düzeyinde azalmaya yol açtığını rapor etmişlerdir (Vrzgula ve Bartko, 1984). Bu çalışmada, %5 zeolit grubunda ALT (P<0.01) düzeyinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı, AST (P<0.05) düzeyinin ise kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azaldığı saptandı. Zeolit katkısı, bıldırcınlarda serum ALP düzeylerini etkilemedi. Bazı yazarlar, diyetle zeolit ilavesinin kan GLU düzeyinde istatistikî açıdan önemli derecede azalmaya yol açtığını bildirirken (Safaeikatouli ve ark., 2011), bir kısım yazarlar da GLU düzeylerinde artışa neden olduğunu rapor etmişlerdir (Alexopoulos ve ark., 2007; Nestorov, 1984). Zeolit GLU düzeyinde değişikliğe neden olmadığını bildiren çalışmalarda mevcuttur (Miles ve Henry, 2007). Vücut metabolizma hızı arttığından

kan GLU konsantrasyonu azalır. Bu nedenle silikat minerallerinin diyetle kullanımı metabolizmada artışa ve gıdaların çok daha fazla etkili bir şekilde sindirimine ve emilimine neden olabilir. Demirel ve ark. (2010) clinoptilolit katkısının kalsiyumun işlerliğini arttırdığını bildirmişlerdir. Artan Ca işlerliği de insülin artışlarına ve dolayısı ile GLU konsantrasyonlarının düşmesine neden olmuş olabilir (İpek ve ark., 2013). Bu çalışmada, %5 zeolit içeren diyetle beslenen bıldırcınlarda GLU (P<0.01) düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında önemli derecede azaldığı görülmüş ve Safaeikatouli ve ark. (2011)'nin yapmış oldukları çalışmayla uyum sağlamıştır.

Zeolitlerin diyetle kullanımıyla ortaya çıkan en önemli kaygılardan birisi non-spesifik absorpsiyon özellikleri ve iyon değişim kapasitelerinden dolayı mineraller gibi diyetle yer alan bazı maddelerle güçlü bir şekilde etkileşime girmeleridir. Bu noktadan hareketle farklı hayvan modellerinde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda değerli sonuçlar ortaya konulmuştur. Zeolitle zenginleştirilen diyetle beslenen farelerde, serum K düzeylerinde %20 oranında artış olduğu bildirilmiştir (Martin ve ark., 2001). Bazı yazarlar farklı hayvan türleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda zeolit katkısının Na, K, Ca ve P düzeylerinde herhangi bir değişiklik oluşturmadığını rapor etmişlerdir (Alexopoulos ve ark., 2007; Vrzgula ve Bartko, 1984; Yannakopoulos ve ark., 2000). Ruminantlarda deneysel periyot boyunca Fe serum konsantrasyonlarının zeolit uygulamasından etkilenmediğini bildiren araştırmacılar olmakla birlikte, zeolit verilen yeni doğan buzağılarda serum Fe konsantrasyonlarının arttığını bildiren araştırmacılar da mevcuttur. (Katsoulos ve ark., 2015; Kincaid, 1999; Pond ve ark., 1984, Vrzgula ve Bartko, 1984). Bu çalışmada, %2.5 ve %5 zeolit uygulanan gruplarda kan Ca ve Mg (P<0.001) düzeylerinin, %5 zeolit grubunda P (P<0.05) düzeylerinin kontrol grubuna göre önemli derecede arttığı tespit edildi. Zeolit katkısı bıldırcınlarda serum Fe düzeylerini etkilemedi.

Sonuç olarak; bıldırcınlarda diyetle zeolit ilavesi ile serum TP, GLU, AST, ALT, ALB, Ca, Mg ve P konsantrasyonlarında tespit edilen değişikliklerin zeolit tüketiminin sistemik etkilerinin bir sonucu olabileceği ve bu durumun hayvan sağlığı ve performansı üzerine negatif bir etki oluşturmadığı kanaatine varılmıştır. Bununla beraber, bıldırcınlarda kullanılması gereken zeolit miktarlarının, organik hayvancılık sistemlerinde kullanım alanı bulabilmesi ve serum biyokimyasal etkinliğinin daha iyi anlaşılabilmesi için, zeolit katkısının artırılarak araştırılmasının yapılmasını da gerektirmektedir.

## Kaynaklar

- Alexopoulos C, Papaioannou DS, Fortomaris P, Kyriakis CS, Tserveni-Goussi A, Yannakopoulos A, Kyriakis SC, 2007: Experimental Study on the Effect of In: Feed Administration of A Clinoptilolite-Rich Tuff on Certain Biochemical and Hematological Parameters of Growing and Fattening Pigs. *Livestock Science*, 111, 230-241.
- Ayed MH, Zghal I, Rekik B, 2011: Effect of sepiolite supplementation on broiler growth performances and carcass yield. *Research Opinions In Animal & Veterinary Sciences*, 1(6), 375-378.
- Çelebi Ş, Macit M, Karaca H, 2004: Yumurta Tavuğu Rasyonlarına Geç Dönemde Zeolit İlavesinin Performans ve Bazı Önemli Yumurta Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. 4. Ulusal Zootekni Bilim Kong. Isparta, pp.405-409.
- Demirel DŞ, Demirel R, Doran İ, 2010: Doğal Zeolitlerin Hayvancılıkta Kullanım Olanakları. *Harran Üniv Ziraat Fak Derg*, 14(2), 13-20
- Duncan DB, 1955: Multiple Range and Multiple F-Tests. *Biometrics*, 11, 1-42.
- Eleroğlu H, Yalçın H, Yıldırım A, Aker A, 2011: Etlik piliç yemine doğal zeolit ilavesinin besi performansı üzerine etkileri. *Hayvansal Üretim*, 52 (1), 24-32.
- Eser H, Yalçın S, Yalçın S, Şehu A, 2012: Broiler karma yemlerinde sepiyolit kullanımının performans, karkas özellikleri ve bazı kan parametreleri üzerine etkileri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (2), 313-318.
- İpek E, Üçer M, Çıkım S, Tanyolac S, 2013: Fazla kilolu ve şişman Türk kadınlarında plazma kalsiyum düzeylerinin risk göstergeleri ve metabolik sendrom ile ilişkisi. *Endokrinolojide Diyalog*, 10(4), 133-138.
- Jurgens MH, 1996: Animal feeding and nutrition, 8th ed. Kendall/Hunt Publishing, Dubuque, IA.
- Katsoulos PD, Roubies N, Panousis N, Karatzias H, 2015: Effect of Long-Term Feeding Dairy Cows on a Diet Supplemented with Clinoptilolite on Certain Serum Trace Elements. *Biol Trace Element Research*, 108, 137-145.
- Kincaid RL, 1999: Assessment of Trace Mineral Status of Ruminants: A Review. *Proc Am Soc Anim Sci*, 1-10.
- Martin-Kleiner I, Flegar-Mestric Z, Zadro R, Reljak D, Stanovic JS, Stojkovic R, Merusic M, Redacic M, Boranic M, 2001: The Effect of The Zeolite Clinoptilolite on Serum Chemistry and Hematopoiesis In Mice. *Food Chem Toxicol*, 39, 717-727.
- Miles RD, Henry PR, 2007: Safety of Improved Milbond-TX When Feed In Broiler Diets at Greater than Recommended Levels. *Anim Feed Sci Tech*, 138, 309-317.
- Nestorov N, 1984: Possible Applications of Natural Zeolites in Animal Husbandry. In: Pond, W.G., Mumpton, F.A. (Eds.), *Zeo-Agriculture. Use of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*. Westview Press Inc, Boulder, Colorado, pp. 167-174.
- Nikolakakis I, Dotas V, Kargopoulos A, Hatzizisis L, Dotas D, Ampas Z, 2013: Effect of Natural Zeolit (Clinoptilolite) on the Performance and Litter Quality of Broiler Chickens. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 1-5.
- Oğuz H, Kurtoğlu V, 2000: Effect of Clinoptilolite on Performance of Broiler Chickens During Experimental Aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 41, 512-517.
- Ouhida I, Perez JF, Gasa J, Puchal F, 2000: Enzymes ( $\beta$ -glucanase and arabinoxylanase) and/or sepiolite supplementation and the nutritive value of maize-barley-wheat based diets for broiler chickens. *British Poultry Science*, 41, 617-624.
- Öztürk E, Erener G, Sarıca M 1998: Influence of Natural Zeolite on Performance of Laying Hens and Egg Quality. *Tr J of Agriculture and Forestry*, 22, 623-628.
- Papaioannou DS, Kyriakis CS, Alexopoulos C, Tzika ED, Polizopoulou ZS, Kyriakis SC, 2004: A Field Study on the Effect of Dietary Use of a Clinoptilolite-rich tuff, Alone or in Combination with Certain Antimicrobials, on the Health Status and Performance of Weaned, Growing and Finishing Pigs. *Research in Veterinary Science*, 76(1), 19-29.
- Parlat SS, Yıldız AO, Oğuz H, 1999: Effect of Clinoptilolite on Performance of Japanese Quail (*C. coturnix japonica*) During Experimental Aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 40, 495-500.
- Pond WG, Laurent SM, Orloff HD, 1984: Effect of Dietary Clinoptilolite or Zeolite Na-A on Body Weight Gain and Feed Utilization of Growing Lambs Fed Urea or Intact Protein as A Nitrogen Supplement. *Zeolites*, 4, 127-132.
- Rizzi L, Simioli M, Roncada P, Zaghini A 2003: Aflatoxin B1 and Clinoptilolite in Feed for Laying Hens: Effects on Egg Quality, Mycotoxin Residues in Livers, and hepatic mixed-function oxygenase activities. *J Food Prot*, 66, 860-865.
- Safaeikatouli M, Jafariahangari Y, Baharlouei A, 2011: An Evaluation on the Effects of Dietary Kaolin and Zeolite on Broilers Blood Parameters, T4, TSH and Growth Hormones. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(3), 233-237.
- Tufan T, Arslan C, Sarı M, 2014: Japon Bildircini rasyonlarına farklı oranlarda klinoptilolit ilavesinin besi performansı, karkas verim özellikleri ve bazı kan parametrelerine etkisi. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, 54(1), 21-27.
- Vrzgula, L, Bartko P, 1984: Effects of Clinoptilolite on Weight Gain and Some Physiological Parameters of Swine. In: Pond, WG, Mumpton FA (Eds.), *Zeo Agriculture. Use Of Natural Zeolites in Agriculture and Aquaculture*. Westview Press Inc, Boulder, Colorado, pp. 161-166.
- Yannakopoulos A, Tserveni-Goussi A, Kassoli-Fournaraki A, Tsirambides A, Michailidis K, Filippidis A, Lutat U, 2000: Effects of Dietary Clinoptilolite-Rich Tuff on the Performance of Growing-Finishing Pigs. In: Coela C, Mumpton FA (Eds.), *Natural Zeolites for the Third Millennium*. De Frede Editore, Napoli, Italy, pp. 471-481.

\*Yazışma Adresi: Mehmet Hanifi DURAK

Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

e-mail: hanifidurak@hotmail.com

## Kliniğimize Gelen Koyun ve Keçi Dystocia Olgularının Değerlendirilmesi: Etiyoloji, Klinik Yaklaşım ve Sonuçlar

Ömer KORKMAZ<sup>1\*</sup>, Hayrettin ÇETİN<sup>2</sup>, Mehmet Osman ATLI<sup>3</sup>, Abuzer Kafar ZONTURLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

<sup>3</sup>Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır, Türkiye.

Geliş Tarihi: 20.10.2016

Kabul Tarihi: 25.01.2017

**Özet:** Bu çalışmada, 2003-2010 yılları arasında, Şanlıurfa ve çevresinde görülen koyun ve keçi güç doğumların etiyojisi, sebepleri, tedavisi ve tedavide alınan sonuçlar değerlendirildi. Araştırma materyalini, güç doğum şikayeti ile kliniğimize getirilen 57 keçi ve 30 koyun, toplam 87 olgu oluşturdu. Tüm olgular, maternal (n=39, %44.83) ve fütal (n=48, %55.17) olmak üzere iki guruba ayrıldı. Maternal kaynaklı dystocia sebepleri sırasıyla prolapsus vajina, yetersiz serviks dilatasyonu (ringwomb) ve uterus inertiası, fütal kaynaklı sebepler ise çoğul gebelik ve fütal geliş/duruş bozuklukları olduğu görüldü. Tedavide 43 olguda sezaryen operasyonu, 40 olguda ekstraksiyon fors ve bir olguda ise laparotomi uygulandı. Sezaryen operasyonu sonucunda 53'ü canlı, 27'si ölü yavru; ekstraksiyon fors ile 25'i canlı, 27'si ölü yavru çıkarıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Koyun, Keçi, Güç doğum, Klinik Değerlendirme.

### Evaluation of Sheep and Goat Dystocia Cases Submitted to Our Clinic: Etiology, Clinical Approach and Results

**Abstract:** In this study, etiology, causes, treatment and results of treatment of sheep and goat dystocias seen in and around Şanlıurfa between 2003 and 2010 were evaluated. The study material consisted of 87 cases of which 57 were goats and 30 sheep brought to our clinic with dystocia complaints. All cases were divided into two groups: maternal (n=39, 44.83%) and fetal (n=48, 55.17%). Prolapsus vagina, inadequate cervical dilatation (ringwomb) and uterine inertia were observed in maternal dystocia cases while multiple pregnancy and fetal disturbances were detected in fetal dystocia cases. Cesarean operation conducted in 43 cases, extraction force in 40 cases and laparotomy in one case were performed in the treatment. As a result of caesarean operation were obtained 53 live, 27 dead fetus. With the extraction force, 25 live and 27 dead fetus were removed.

**Keywords:** Sheep, Goat, Dystocia, Clinical evaluation.

### Giriş

Güç doğum (Dystocia); doğumun belli olan zamanda şekillenmediği veya herhangi bir müdahale olmadan gerçekleşmediği, anne veya yavrunun hayatlarının tehlikeye girdiği olgulardır. Küçük ruminantlarda, doğum kanalının anatomik yapıları sebebi ile güç doğum olguları nadir olup (Çetin ve Kocamüftüoğlu, 2015) ölüm oranı oldukça yüksektir (Sobiraj, 1990). Ayrıca diğer sistemik hastalıklara göre daha az görülse de küçük ruminantlarda reproduktif açıdan gözlenen en önemli patolojiler güç doğumlardır (Erk ve Akkayan 1970; Kuru ve ark., 2016) ve bu problem ülkemiz hayvancılığının önemli bir yerini tutan koyun ve keçi yetiştiriciliğinde amaçlanan ekonomik kazancı tehdit etmektedir. Küçük ruminantlarda dystocia ile karşılaşma oranını %4.1-34 aralığında olduğu bildirilmektedir (George, 1975; George, 1976; Scott, 2003). Retrospektif bir çalışma sonuçlarına göre (Kaymaz ve ark., 2004), Doğum ve Jinekoloji Kliniği'ne getirilen koyunlarda %45.11, keçilerde ise %25.14'ünün güç doğum problemi ile karşılaştığı

gözlemlenmiştir. Dystocia, en çok ilk doğumlarda, çoğul gebeliklerde, erkek yavruarda, fütal pelvik orantısızlıkta ve bahar aylarındaki doğumlarda rastlanılmaktadır (Çetin ve Kocamüftüoğlu, 2015; George 1975; George 1976).

Koyun ve keçilerde en sık görülen maternal dystocia nedenleri; uterus inertiası, serviks uterusinin yetersiz dilatasyonu (ringwomb), prolapsus vajina, uterus torsiyonu ve vulva/vajina darlığıdır. Fütal kaynaklı dystocialarda ise; yavru büyüklüğü, ikizlik ve presentasyon, pozisyon ile duruş bozuklukları olduğu bildirilmiştir (Ali, 2011; Çetin ve Kocamüftüoğlu, 2015; Hussain ve Zaid, 2010; Scoot 2007). Güç doğumun tedavisinde servikal dilatasyon ve kontraksiyonları arttırmak amacıyla çeşitli medikal uygulamalar, ekstraksiyon fors, fütotomi ve sezaryen operasyonu uygulanmaktadır. Bu uygulamalar içerisinde sezaryen operasyonların klinik başarısının en yüksek seviyede olduğu görülmüştür (Brounts ve ark., 2004; Majeed, 1994; Majeed ve Taha, 1995).

Sunulan çalışmada, Şanlıurfa bölgesinde görülen koyun ve keçilerde karşılaşılan dystocia olguları etioloji ve klinik özellikleri yönünden değerlendirilerek uygulanan tedavi yöntemleri ve elde edilen sonuçların sistematik bir şekilde sunulması ve veteriner klinik sahada faydalı olabilecek pratik bilgilerin klinisyenlere aktarılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

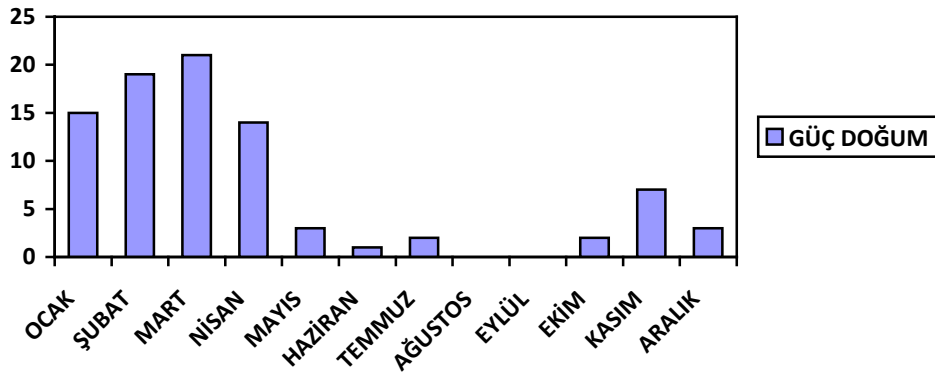
Çalışmanın materyalini, 2003-2010 yılları arasında, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne getirilen 57'si keçi, 30'u koyunda görülen toplam 87 dystocia olgusu oluşturdu. Tüm olgularda görüldüğü ay, tür, ırk, yaş, güç doğum nedeni, tedavi yöntemi, elde edilen canlı ve ölü yavrular kaydedildi. Çalışmada elle kurtarma ve sezaryen operasyonları sonrası elde edilen canlı yavru oranları ve güç doğum sebepleri arasındaki farkın anlamlılığı SPSS (Statistic Packet of Social Science) 14.01 (serial: 9869264) Paket Programında, chi square testi ile değerlendirildi.

## Bulgular

Küçük ruminantlar dystocia yönünden incelendiği, çalışmanın yapıldığı yıllarda, kliniğimize gelen 96 keçinin 57'sinde (%59.38), 79 koyunun

30'unda (%37.98) olmak üzere toplam 175 hayvanda 87 (%49.71) dystocia olgusu ile karşılaşılmıştır.

Karşılaşılan olgularının yaş dağılımları Tablo 1'de sunulmuştur. Buna göre tüm hayvanların 1,5-7 yaş aralığında olduğu görüldü. 1,5 yaşında 3 (%3.45), 2 yaşında 25 (%28.74), 3 yaşında 18 (%20.69), 4 yaşında 21 (%24.14), 5 yaşında 8 (%9.19), 6 yaşında 11 (%12.64), 7 yaşında 1 (%1.15) adet olgu kaydedildi. Çalışmada en çok 2 yaşında 25/87, en az da 7 yaşında 1/87 güç doğumla karşılaşıldığı, tüm olguların %73.56 (64/87)'sinin 2-4 yaş aralığı koyun ve keçilerde olduğu gözlemlendi. Bu olguların kliniğimize geldiği aylar incelendiğinde Ocak ayında 15 (%17.24), Şubat 19 (%21.84), Mart 21 (%24.14), Nisan 14 (%16.09), Mayıs 3 (%3.45), Haziran 1 (%1.15), Temmuz 2 (%2.29), Ekim 2 (%2.29), Kasım 7 (%8.05) ve Aralık ayında 3 (%3.45) dystocia olgusu kaydedildi. Buna göre olguların en çok %24.14 (21/87) oranında Mart ayında geldiği, Ocak-Mart arası üç aylık süreçte tüm dystocia olgularının %63.22 (55/87)'sinin görüldüğü, Ağustos-Eylül arası hiç bir olguya rastlanmadığı kaydedildi (Tablo 1) (Şekil 1). ırk dağılımlarına yönünden incelendiğinde; 16 İvesi (%18.39), 10 Akkaraman (%11.50), 3 Morkaraman (%3.45), 1 Dağlıç (%1.15) ırkı koyunda, 25 Halep (%28.73), 16 Kıl Keçisi (%18.40), 10 Kilis (%11.50), 6 Sanen ırkı (%6.89) keçide dystocia görüldü.



Şekil 1. 2003-2010 yılları arasında kliniğimize getirilen koyun keçi dystocia olgularının aylara göre dağılımı

Tablo 1. 2003-2010 yılları arasında kliniğimize getirilen koyun keçi dystocia olgularında ay ve yaş dağılımı

Ay	Ocak	Şubat	Mart	Nisan	Mayıs	Haziran	Temmuz	Ekim	Kasım	Aralık	
n	15	19	21	14	3	1	2	2	7	3	
%	17.24	21.84	24.14	16.09	3.45	1.15	2.29	2.29	8.05	3.45	
Yaş	1.5	2	3	4	5	6	7				
n	3	25	18	21	8	11	1				
%	3.45	28.74	20.69	24.14	9.19	12.64	1.15				

Kliniğimize gelen küçük ruminant dystociaların etiyojik incelemeleri sonucunda, %44.83'ünün maternal kaynaklı olup, %21.84 oranla (19/87), en sık ringwomb görüldü. Diğer maternal sebeplerden prolapsus vajina 13 (%14.94), uterus inertiası 5 (%5.75), pelvis kanalı darlığı 1 (%1.15), vulva/ vajina darlığı 1 (%1.15) olguda kaydedildi. Fötal kaynaklı dystocia ise %55.17 oranında olup bunlardan en çok, %20.69 (18/57), ikizlik ve %10.34 (9/57) oranında fötopelvik orantısızlık görüldü. Presentasyon bozuklukları olarak transversal sırt bel geliş 4 (%4.59) olguda gözlemlendi. Pozisyon bozuklukları olarak, longitudinal anterior presentasyon dorsa pubical pozisyon 1/87 (%1.15), longitudinal posterior presentasyon lumbo pubical pozisyon 2/87 (%2.30), sağ lumbo ilial pozisyon 1/87 (%1.15) toplam 4/87 olguda (%4.59) kaydedildi. Duruş bozuklukları olarak ön bacakların bükülmesi 3/87 (%3.45), önden gelişte başın yanlara bükülmesi 7/87 (%8.04) olguda gözlemlendi. Yavru anomalileri, ankiloz

1/87 (%1.15), şistosoma refleksüm 1 (%1.15) vakada kaydedildi. Bir hayvanda da (%1.15) güç doğum sebebi olarak sekonder abdominal ektopik gebelik karşılaşıldı (Tablo 2).

Olguların 43 (%49.43)'üne sezaryen operasyonu ile 38 (%43.68)'ine ekstraksiyon, 2'sine fütotomi (%2.30), 1 (%1.15)'i de laporotomi operasyonu ile müdahale edildi. Üç olguda (%3.45) ise hasta sahibinin tedaviyi kabul etmemesi nedeni ile mecburi kesim uygulandı. Sezaryen operasyonu ile 35'i erkek, 45'i dişi toplam 80 yavrunun 27 (%33.75)'si ölü, 53 (%66.25)'ü canlı olarak alındı. Ekstraksiyon forsa 33'ü erkek, 19'u dişi toplam 52 yavrunun 27 (%51.92)'si ölü, 25 (%48.08)'i canlı olarak doğurtuldu (Tablo 3). Güç doğuma müdahale komplikasyonları yönünden incelendiğinde sezaryen operasyonundan sonra 3 yavruya yaşamının ilk günlerinde ölüm, elle müdahalede ise bir olguda doğum sonrası annede serviko uteral kavşakta kanama olduğu gözlemlendi.

**Tablo 2.** 2003-2010 yılları arasında kliniğimize getirilen koyun keçilerde görülen dystocia sebepleri

Yavruya ait sebepler	n (%)	Anaya ait sebepler	n (%)
1-Yavru büyüklüğü	9 (10.34)	1-Pelvis kanalı darlığı	1 (1.15)
2-İkizlik	18 (20.69)	2-Ringwomb	19 (21.84)
3-Presentasyon Pozisyon Bozukluğu	18 (20.69)		
a)Transversal sırt bel geliş	4 (4.59)	3-Prolapsus vajina	13 (14.94)
b)Longitudinal anterior presentasyon dorsa pubikal pozisyon	1 (1.15)	4-Uterus inertiası	5 (5.75)
c)Longitudinal posterior presentasyon lumbo pubikal pozisyon	2 (2.30)	5-Vulva/vajina darlığı	1 (1.15)
d)Sağ lumbo ilial pozisyon	1 (1.15)		
e)Ön bacakların bükülmesi	3 (3.45)		
f)Önden gelişte başın yanlara deviasyonu	7 (8.04)		
4-Ankiloz	1 (1.15)		
5-Schistosoma refleksüm	1 (1.15)		
6-Ektopik gebelik	1 (1.15)		
<b>Toplam</b>	<b>48 (55.17)</b>		<b>39 (44.83)</b>

**Tablo 3.** 2003-2010 yılları arasında kliniğimize getirilen koyun keçi dystocia olgularında tedavi protokollerine göre elde edilen canlı ve ölü yavru sayıları

	n (%)	Ölü yavru n (%)	Canlı yavru n (%)	Toplam yavru n (%)
Sezaryen operasyonu	43 (49.43)	27 (% 33.75)	53 (% 66.25) <sup>a</sup>	80 (100)
Ekstraksiyon fors	38 (43.67)	27 (% 51.92)	25 (% 48.08) <sup>b</sup>	52 (100)
Mecburi kesim	3 (3.45)			
Fütotomi	2 (2.30)	2		2
Laporotomi	1 (1.15)	1		1
<b>Toplam</b>	<b>87 (100)</b>	<b>57</b>	<b>78</b>	<b>135</b>

Aynı sütündeki farklı harfleri taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05)

## Tartışma ve Sonuç

Kaymaz ve ark., (2004), küçük ruminantlarda karşılaşılan en büyük problemin güç doğumlar olduğunu bildirmektedir. Wosu ve Anene (1990) keçilerde %49.5 oranla reproduktif hastalıkların en çoğunu güç doğum olduğunu belirtmektedir. Sunulan çalışmada, benzer şekilde, kliniğe getirilen küçük ruminantların yarısının (87/175; %49.71) güç doğum olgularının oluşturduğu dikkat çekmektedir. Buna rağmen küçük ruminantlarda sürü bazında

tedavi uygulamalarının yapıyor olması ve diğer ekonomik sebeplerden dolayı birçok sürü sahibinin obstetrik acillerde kendi müdahale ya da mecburi kesimi tercih etmesi ve veteriner kliniklerine, küçük ruminantların daha az getirilmesi sahada karşılaşılan bu olguların gerçek sayısı ve genel özellikleri konusunda bir yanlısına doğurmaktadır.

Koyun ve keçilerde ilk doğumlarda güç doğuma daha sık rastlanıldığı belirtilmektedir (Çetin ve

Kocamüftüoğlu, 2015; George, 1975; George, 1976). Bir çalışmada (Kloss ve ark., 2002), tüm güç doğumların %52'sinin ilk ve ikinci gebeliklerde gözlemlendiği bildirilmektedir. Verilen bilgilere paralel olarak sunulan çalışmada, güç doğuma en çok 2 yaşında 25/87 oranında rastlandığı, tüm olguların %73.56 (64/87)'sının 2-4 yaş aralığında gözlemlendiği kaydedildi. İlk doğumlarda ringwomb ve prolapsus vagina ile yoğun karşılaşılması da erken yaşlarda güç doğum riskini arttırdığı bildirilmektedir (Kerr, 1999). Çalışmamızda güç doğum probleminin ilk doğumlarda daha sık olmasının sebebi, gelişimini daha tam tamamlayamamış doğum kanalından ve endokrin sisteme bağlı sorunlardan kaynaklı olabileceği kanaatindeyiz. Küçük ruminantlar mevsime bağlı poliöstrik hayvanlardır ve gebelik süreleri ortalama 150 gündür. Şanlıurfa bölgesinde genelde Eylül başından Ekim sonuna kadar koç katımı uygulandığından doğumlar en çok Ocak başı ile Mart sonunda görülmektedir. Doğumların sık görüldüğü bu aylarda güç doğumları daha fazla görülmesi çok doğaldır.

Küçük ruminantlarda güç doğum sebeplerine bakıldığında, güç doğumların %27'sinin tek ve %73'ünün ikiz yavruya olduğu bildirilmektedir (George, 1976). En sık karşılaşılan güç doğum sebeplerinin presentasyon bozukluğu olduğu kaydedilmektedir (George, 1975; Kuru ve ark., 2016). 1,510 Merinos koyununun incelendiği bir çalışmada güç doğumların (Kloss ve ark., 2002), %50'sinin maternal, %45'inin fetal kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada Maternal güç doğumların %64'ünün ringwomb, fetal güç doğumların ise %67'sinin presentasyon, pozisyon ve duruş bozukluklarından kaynaklandığı açıklanmıştır. Alaçam (1974) ise, güç doğum sebeplerinin %25.6'sının maternal, %75.4 ünün fetal kaynaklı olduğunu bildirmekte ve en sık karşılaşılan sebep ise pozisyon bozukluğu olduğunu söylemektedir. Küçük ruminantlarda güç doğumların en büyük sebebinin ringwomb olduğu bildirilmektedir (Deen, 1995). Sunulan çalışmada, güç doğum sebeplerinin %44.83'ünün maternal (39/87) olduğu en sık %21.84 oranla (19/87) ringwomb olgusu ile karşılaşıldığı görüldü. Fetal sebepler ise %55.17 (48/87) oranında görüldü ve %20.69'luk oran ile en sık presentasyon, pozisyon, duruş bozuklukları ve aynı oranda ikizlik sebep olarak kaydedildi. Sunulan çalışmada Kloss ve ark. (2002) hariç diğer araştırmacılar ile paralel (Alaçam, 1974; George, 1975; George 1976; Deen 1995; Kloss ve ark., 2002) olarak maternal sebepler ile daha sık karşılaşılmış ve en çok ringwomb (%21.84), ikizlik (%20.69), presentasyon pozisyon ve duruş bozuklukları (%20.69) ve prolapsus vagina (%14.94) gözlenmiştir. Gözlemlerimiz esnasında küçük ruminant güç doğum probleminde anılan sebeplerin birbirleri ile

bağlantılı olması sınıflandırılmada bazı problemlere yol açabileceği şüphesi uyandı. Bu gözlemlerden dolayı güç doğum sebeplerinin insidensinin araştırmacılar arasında farklı çıkmasının sebebinin, sınıflandırılmadaki farklılıklardan kaynaklanabileceği gibi bölgesel, iklim ve beslenme bakım farklılıklarından da olabileceği kanaati oluşmuştur.

Küçük ruminant güç doğumların %12'sinde tedavide sezaryen operasyonu yapıldığı bildirilmektedir (Kloss ve ark., 2002). Bir çalışmada (Alaçam, 1974), 129 adet güç doğumun 47'sinde presentasyon ve pozisyonun düzeltilmesi, 28'inde ekstraksiyon, 34'ünde sezaryen, 13'ünde fütotomi ve 3'ünde de ilaçla müdahale, 4'ünde de serviks uteriye açma işlemleri uygulanmıştır. Majeed ve Taha (1995), İvesi ırkına ait 332 güç doğum vakasının 146'sına elle çıkarma, 48'ine farmakolojik ajanlar ile uyarım, 138'ine de sezaryen operasyonu uygulamışlar ve çalışmalarında güç doğuma müdahalede en başarılı tedavi yönteminin sezaryen operasyonu olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki küçük ruminantlarda sezaryen operasyonu yapılan güç doğum vakalarının %70'i ringwomb dur (Kloss ve ark., 2002; Brouts ve ark, 2004). Koyunda prolapsus vajina olgularında sezaryen operasyonu gereksinimi 10 kat artmaktadır (Scott, 1989). Güç doğuma yardım girişimlerinde süre uzadıkça yavru ölümlerin görülme sıklığı da artmaktadır (Brouts ve ark., 2004). Sezaryen operasyonunda başarı oranı, kuzunun yeni öldüğü ya da yaşadığı olgularda % 97.8 iken, amfizem ve otolizin başladığı olgularda ise %57.1 e düştüğü bildirilmektedir (Scott, 1989). Bu çalışmada da güç doğum tedavisinde %49.43 oranla (43/87) en çok sezaryen operasyonu, 38 olguda ise (%43.67) ekstraksiyon fors uygulandı. Sezaryen operasyonu sonrası 27 ölü (%33.75) 53 canlı (%66.25) yavru alınırken, elle çıkarmada 27 ölü (%51.92) 25 canlı (%48.08) yavru doğurtuldu.

Sonuç olarak; 2003-2010 yılları arasında Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Kliniği'ne muayene ve tedavi amacıyla getirilen küçük ruminantlarda reproduktif açıdan en sık karşılaşılan problemin güç doğum olduğu gözlemlendi. Güç doğum sebebi olarak en sık ikizlik, ringwomb, presentasyon, pozisyon, duruş bozuklukları ve prolapsus vajina ile karşılaşıldı. Sezaryen operasyonun, küçük ruminantlarda, güç doğum tedavisinde kullanılabilecek başarılı bir tedavi seçeneği olduğu kanaatine varıldı.

## Kaynaklar

Alaçam E, 1974: 1963-1973 yılları arasında kliniğimize getirilen güç doğumun sebepleri, uygulanan kurtarma yöntemleri ve alınan sonuçlar. *Ank Üniv Vet Fak Derg*, 21, 3-4, 243-248.



- Ali AMH, 2011: Causes and management of dystocia in small ruminants in Saudi Arabia. *J Agr and Vet Sci*. 4,2, 95-108.
- Brounts SH, Hawkins JF, Baird AN, Glickman LT, 2004: Outcome and subsequent fertility of sheep and goats undergoing cesarean section because of dystocia, 110 cases (1981-2001). *JAVMA*, 224, 2, 275-279.
- Çetin H, Kocamüftüoğlu M 2015: Doğum ve Güç Doğumlar. In "Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji", Ed; Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. 2. Baskı. Medipres, Malatya, Türkiye.
- Deen A, 1995: Incomplete cervical-dilation in goats. *Indian Vet. J*, 72, 2, 174-175.
- Erk H, Akkayan C, 1970: 1952-1969 Yılları Arasında Kliniğimize Getirilen Hayvanların Doğum Ve Jinekolojik Hastalıklarının Genel Analizi. *Ank Üniv Vet Fak Derg*, 17, 4, 500-517.
- George JM, 1976: The incidence of dystocia in Dorset Horn ewes. *Aust Vet J*, 1976, 52, 11, 519-523.
- George JM, 1975: The incidence of dystocia in fine-wool Merino ewes. *Aust Vet J*, 51, 5, 262-265.
- Hussain SO, Zaid NW, 2010: Dystocia in goats, causes and treatment. *Al-Qadisiya Journal of Vet Med Sci*, 9, 1, 63-68.
- 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, 1, 35-41.
- Kerr NJ, 1999: Occurrence, etiology and management of ringwomb in ewes. Master of science in animal and veterinary sciences. Morgantown, West Virginia, USA.
- Kloss, S, Wehrend A, Failing, K, Bostedt H, 2002: Investigations about kind and frequency of mechanical dystocia in ewes with special regard to the vaginal prolapse ante partum. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 115, 7-8, 247-251.
- Kuru M, Mülazımoğlu SB, Kaya D, 2016: Koyun ve keçilerde güç doğum. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci Obstet Gynecol-Special Topics*. 2, 1, 74-77.
- Majeed AF, Taha MB 1995: Obstetrical disorders and their in iraqi-awassi ewes. *Small Ruminant Research*. 17, 1, 65-69.
- Majeed AF, 1994: Obstetrical problems and their management in Iraqi Goats. *Small Ruminant Research*. 14, 1, 73-78.
- Scott PR, 2003: A questionnaire survey of ovine dystocia management in the United Kingdom. *Animal Welfare*. 12 (1), 119-122.
- Scott PR, 1989: Ovine ceasarean operatins: A study of 137 field cases, *Br Vet J*, 145, 6, 558-564.
- Sobiraj A, 1990: Ante partum vaginal prolapse in sheep. An unsolved problem, *Tierarztl Prax*, 18, 1, 9-12.
- Wosu, LO, Anene BM, 1990: Incidence and seasonality of reproductive disease conditions in small ruminants in Nsukka area, Nigeria. *Beitr Trop Landwirtsch Veterinarmed*. 28, 2, 185-189.

**\*Yazışma Adresi:** Ömer KORKMAZ

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: omerkorkmaz1978@gmail.com

## Ratlarda Parasetamol ile Oluşturulan Hepatotoksisite Üzerine *Taraxacum officinale* Etanol Ekstraktının Etkisi\*\*

Esra AKTAŞ ŞENOCAK, Betül APAYDIN YILDIRIM\*

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.

Geliş Tarihi: 20.10.2016

Kabul Tarihi: 26.12.2016

**Özet:** Ratlarda parasetamol ile oluşturulan hepatotoksisite üzerine *Taraxacum officinale* etanol ekstraktının kan ve karaciğer dokusundaki bazı biyokimyasal parametrelere ve karaciğer dokusunun histopatolojisi üzerine etkileri araştırıldı. Bu çalışmada, 5 aylık yaşta 36 adet Sprague Dawley rat kullanıldı. Sprague Dawley ratlar rastgele her grupta 6 rat olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Parasetamol (PARA) verilecek gruplardaki hayvanlar 24 saat aç bırakılıp ekstrakt verildikten 1 saat sonra 2 g/kg oral olarak (p.o.) PARA verildi. 1.Grup (Kontrol Grubu), %5'lik DMSO intraperitoneal (i.p.), 2.Grup (TOE1 Grubu), 200 mg/kg/gün/i.p. *Taraxacum officinale* ekstraktı (TOE) %5'lik DMSO'da çözülerek i.p, 3.Grup (TOE2 Grubu), 250 mg/kg/gün/i.p. *Taraxacum officinale* ekstraktı, 4.Grup (PARA Grubu), 2 g/kg/p.o. Parasetamol, 5.Grup (PTOE1 Grubu), Parasetamol 2 g/kg/gün/p.o. + TOE 200 mg/kg/gün/i.p, 6.Grup (PTOE2 Grubu), Parasetamol 2 g/kg/gün/p.o. + TOE 250 mg/kg/gün/i.p 8 gün boyunca uygulandı. Çalışma sonunda ratlardan alınan kan ve karaciğer dokusundan biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı. Parasetamol grubunda plazma AST, ALT, ALP, MDA, CAT ve nitrit düzeyleri; karaciğer MDA, nitrit ve nitrat düzeyleri kontrol grubuna göre artarken (P<0.001); plazma GSH (P<0.001), SOD (P<0.001) ve GPx (P<0.05) düzeyleri; karaciğer GSH, CAT ve SOD (P<0.001) düzeyleri anlamlı olarak azaldı. Parasetamolün ratlarda oluşturduğu hepatotoksisiteyi *Taraxacum officinale* bitkisinin toprak üstü kısımlarından yapılan etanol ekstraktının 200 mg/kg uygulanan miktarının hepatotoksisiteyi anlamlı olarak azalttığı ve lipid peroksidasyonu önlediği, TOE 250 mg/kg uygulanan hayvanlarda toksik etki yaptığı tespit edildi. Elde edilen ekstraktın hepatotoksisite üzerine ve plazma ve karaciğer biyokimyasal parametreleri üzerine olumlu etkilerinin olduğu saptansa bile karaciğerde oluşan hasarı düzeltmek için zamana gereksinim duyulduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, Ekstrakt, Lipid peroksidasyonu, Parasetamol, *Taraxacum officinale*.

### The Effect of *Taraxacum officinale* Ethanol Extract on Paracetamol Induced Hepatotoxicity in Rats

**Abstract:** In this study was investigated on the effects on the some biochemical and histopathological parameters in plasma and liver tissue of *Taraxacum officinale* ethanol extract of paracetamol induced hepatotoxicity in rats. In this study was utilized 36 Sprague Dawley male rats, aged 5 months. Rats were divided 6 groups of 6 rats each, randomly. Animals of paracetamol administered were fasted 24 hour and 2 g/kg peros (p.o) Paracetamol was given after the 1 hour extract was given. 1.Group Control 5% DMSO intraperitoneal (i.p), 2. Group TOE1 200 mg/kg/day/i.p. *Taraxacum officinale* extract (TOE) was dissolved in 5% DMSO in distilled water, i.p., 3. Group TOE2 250 mg/kg/day/i.p. *Taraxacum officinale* extract, 4. Group PARA 2 g/kg/p.o. Paracetamol, 5. Group PTOE1; Paracetamol 2 g/kg/day/p.o.+ TOE 200 mg/kg/day/i.p, 6. Group PTOE2 Paracetamol 2 g/kg/day/p.o.+ TOE 250 mg/kg/day/i.p were administered for 8 day. At the end of the study biochemical and histopatological analyses were made from sample of blood and liver tissue. Plasma AST, ALT, ALP, MDA, CAT and Nitrite levels; liver tissue Nitrite and Nitrate levels were increased (P<0.001); plasma GSH (P<0.001), SOD (P<0.001) and GPx levels (P<0.05); liver tissue GSH, CAT, and SOD levels (P<0.001) were decreased significantly in paracetamol group compared with control group. Paracetamol in rats formed hepatotoxicity *Taraxacum officinale* Wig. aerial part made from ethanol as extract is used TOE 100 mg/kg of the amount of hepatotoxicity significantly decreased and prevented lipid peroxidation. Toxic effect was determined in animals administered TOE 250 mg/kg. Even if the obtained extract had positive effects on hepatotoxicity and biochemical parameters in liver and plasma, it was concluded that it was needed to for repair the damage of the liver.

**Keywords:** Antioxidant, Extract, Lipid peroxidation, Paracetamol, *Taraxacum officinale*.

### Giriş

Türkçe adı Karahindiba olan *Taraxacum officinale* papatyagiller (*Asteraceae*) familyasının bir üyesidir. Daha çok kuzey yarım kürede özellikle Avrupa ve Asya'nın ılıman bölgelerinde sıkça rastlanan bir türdür. Türkiye'de ise çoğunlukla

Nisan-Mayıs aylarında, çayırlarda, yol kenarlarında yetişebilen çok yıllık sarı renkte çiçekleri olan bir bitkidir. *Taraxacum officinale* (Karahindiba-Dandelion) içerdiği terpenoid, sterol, kalsiyum, potasyum, vitamin A, nikotinik asit ve vitamin C gibi

birçok önemli bileşiği içeren, besleyici değere sahip olan ve sıkça rastlanan bir bitkidir (Davis, 1965; Koç, 2002). Bu özelliklerinden dolayı özellikle karaciğer ve safra kesesi hastalıklarında taze olarak 5-6 tane çiçek sapının yenmesi kronik karaciğer iltihaplarında ve karaciğer yağlanması iyileşme sağlayarak safra kesesinin çalışmalarını düzenlediği ifade edilmiştir. Bununla beraber şeker hastalığı, cilt hastalıkları, vitamin eksikliği, damar sertliği, kan şekerini düşürmede, iştah açılmasında, kanın temizlenmesinde, kansızlıkta, romatizma ve gut hastalıklarında, kemik bütünlüğünün korunmasında, mide sıvılarını düzene sokarak mideyi atık maddelerden temizleme ve bazı kanser türlerinde büyük etkiye sahip olmasına rağmen pek çok kişi tarafından tanınmayıp zararlı bir ot olarak bilinir (Anonim, 2013a; Anonim, 2013b; Fortea ve ark., 2009; Koç, 2002). Karahindiba'nın bileşimindeki seskiterpen laktonlar ve fenil propanoid sayesinde anti-inflamasyon etkisinin olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda barındırdığı terpenler, polisakkarit bileşenleri; bağışıklık sistemini düzenleyici, trombosit birikimini önleyici ve karaciğer koruyucu etkilere sahiptir (Adam, 2012; Sigstedt ve ark., 2008). B, C, D, E vitaminlerinin yanı sıra kolin, inozitol, lesitin, mineraller ve oligoelementleri (kalsiyum, sodyum, magnezyum, demir, bakır, fosfor, çinko, manganez) bulundurması açısından oldukça önemli bir bitkidir. Ayrıca besleyici değeri olan Karahindiba, yüksek oranda potasyum içermesinden dolayı en iyi doğal potasyum kaynaklarından biridir (Gallaher ve ark., 2006).

*Taraxacum officinale* (karahindiba) bitkisini içeren yapraklı sebzelerle oluşturulan karışımın plazma, karaciğer, kalp ve böbrekte faydalarıyla birlikte antioksidan seviyeleri (glutasyon ve  $\beta$ -karoten) ve antioksidan enzimlerinin aktivitelerini (süperoksit dismutaz, peroksidaz, redükte glutasyon) farelerde arttırdığı ayrıca lipid peroksidasyonunu da anlamlı olarak azalttığı görülür. *Taraxacum officinale*'nin özellikle kök ve yapraklarının ratlara uygulanmasıyla endojen antioksidan profilinde gelişim gözlenir (Champe ve ark., 2007; Kuntz ve Kuntz, 2008). Parasetamol (Asetaminofen-APAP), 1950 yılından beri sıklıkla kullanılan analjezik ve antipiretik özelliklere sahip ilaçlardan biridir (Kayaalp, 2005). Parasetamolün aşırı dozda alınmasıyla sitokrom p-450 mikrozomal enzimleri aracılığıyla reaktif ara ürün olan NAPQI (N-asetilbenzokinonimin)'nin derişiminin artmasıyla hepatik nekroza ve ileri durumlarında da karaciğer yetmezliğine neden olduğu görülür (Jaeschke ve Bajt, 2006). NAPQI'nın birikmesi vücuttaki serbest GSH'ın bağlanmasını sağlayarak hücrede var olan GSH'ı tüketir bu da hücrede oksidatif stresin oluşumuna yol açar. NAPQI sülfhidril (-SH) gruplarını okside etmesine neden olup  $Ca^{++}$  konsantrasyonu-

nun artmasına ayrıca NAPQI hücre içi proteinlerini yok ederek hücrenin ölümüne yol açar (Rang ve ark., 2011).

Bu çalışmada; *Taraxacum officinale* bitki ekstraktının hepatoprotektif ve antioksidan özelliklerini araştırmak üzere, kanda AST (Aspartat transaminaz), ALT (Alanin transaminaz), ALP (Alkalen Fosfataz) düzeyleri ile MDA (Malondialdehid), GSH (Glutasyon), CAT (Katalaz), SOD (Süperoksit dismutaz), GPx (Glutasyon peroksidaz), Nitrit, Nitrat ve karaciğer dokusundaki MDA, GSH, CAT, SOD, GPX, Nitrit, Nitrat düzeyleri ile birlikte karaciğer dokusunun histopatolojik muayenesiyle parasetamol ile oluşturulan deneysel hepatotoksisite üzerindeki koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

## Materyal ve Metot

**Hayvan materyali:** Çalışma için kullanılan ratlar Atatürk Üniversitesi'ne bağlı Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından sağlanmış olup 25.03.2013 tarih ve 36643897-475 sayılı yazı ile gereken etik kurul belgesi ile onaylanmıştır. Araştırma için 5 (beş) aylık olan 36 adet Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı. Canlı ağırlıkları 250-300 g olan ratlar 12 saat aydınlık / karanlık döngüsünde  $22 \pm 2$  °C oda sıcaklığında tutuldular. Bir hafta süreyle ortama adaptasyonları sağlanan ratlar çalışma boyunca standart rat yemi ve musluk suyu ile ad libitum beslendiler.

**Taraxacum officinale ekstraktı:** Araştırmada kullanılan Karahindiba bitkisi çiçekli dönemde toprak üstü aksanı toplanarak gölgede kurutuldu. Daha sonra bu bitki öğütülerek, Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Uçucu Yağ Laboratuvarında 48 saat süre ile etil alkolde bekletilip süzüldü. Rotary evaporatör yardımıyla çözücünün uzaklaştırılmasının ardından ekstreler,  $+4$  °C'de buzdolabında muhafaza edildi (Kordali ve ark., 2009).

**Parasetamol materyali:** Ratlarda toksisite oluşturmak amacıyla kullanılan parasetamol, piyasadan temin edilip, 2 g/kg Parasetamol ; %1'lik karboksimetilselüloz (CMC), 1xPBS tamponunda çözüldü ve ratlara oral yolla 2 cc uygulandı (Albayrak, 2013).

**Deneysel uygulamalar:** Ratlar rastgele her grupta 6 rat olacak şekilde 6 gruba ayrıldı. Parasetamol verilecek gruplardaki hayvanlar 24 saat aç bırakılıp ekstrakt verildikten 1 saat sonra 2 g/kg p.o. parasetamol verildi. 1. Grup Kontrol grubu %5'lik DMSO i.p, 2. Grup TOE1 grubu 200 mg/kg/gün/i.p. *Taraxacum officinale* ekstraktı %5'lik DMSO'da çözülerek i.p, 3. Grup TOE2 grubu 250

mg/kg/gün/i.p. *Taraxacum officinale* ekstraktı, 4. Grup PARA Grubu, 2 g/kg/p.o. Parasetamol, 5. Grup PTOE1 grubu Parasetamol 2 g/kg/gün/p.o.+TOE 200 mg/kg/gün/i.p., 6. Grup PTOE2 grubu Parasetamol 2 g/kg/gün/p.o.+TOE 250 mg/kg/gün/i.p 8 gün boyunca uygulandı. Çalışma sonunda ratlardan alınan kan ve karaciğer dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik analizler yapıldı. Alınan kan lityum heparinli tüplere aktararak, 3000 rpm'de, +4 °C'de 10 dk santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı alınan dokuların bir kısmıyla beraber biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20 °C'de deep freeze de saklandı. Ratlardan elde edilen karaciğer dokuları 1/10 oranında 0.1 M, pH 7.4 fosfat tamponu ile homojenize edilerek 1700xg'de santrifüj edildikten sonra süpernatantlar deney için kullanıldı. Alınan karaciğerin diğer bir kısmı %10'luk formalin içine konulup histopatolojik analizler yapıncaya kadar saklandı.

**Biyokimyasal analizler:** AST, ALT, ALP tayinleri için analizde TML ticari kiti kullanıldı. Plazmada MDA (Yoshioka ve ark., 1979), GSH (Tietze, 1969); plazma ve karaciğer dokusunda CAT (Goth, 1991), SOD (Sun ve ark., 1988), GPx (Matkovics ve ark., 1988); karaciğer dokusunda MDA (Placer ve ark., 1966), GSH (Ball, 1996; Fernandez ve Videla, 1981) ve Nitrit ve Nitrat (Stahr, 1977) düzeyleri spektrofotometrik olarak ölçüldü (Biotechepocha UV-Visible EIA Spektrofotometre).

**Histopatolojik analizler:** Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan karaciğer dokuları %10'luk formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildikten sonra, akan çeşme suyunda 10 saat yıkandı. Rutin doku takibinde alkol (70°, 80°, 90°, 96° ve 100°) ve ksilol serilerinden geçtikten sonra parafinde bloklara

gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alınıp lam üzerinde preparatlar hazırlandı. Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar Hematoksilen-Eozin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi.

**İstatistiksel analizler:** Tüm gruplar arasındaki farklılığın önemi için SPSS 11.5 paket programı kullanılarak varyans analizi, çoklu karşılaştırma için Duncan testi yapıldı (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu, 1998).

## Bulgular

**Biyokimyasal bulgular:** Parasetamol ile oluşturulan hepatotoksosite ve TOE uygulanan grupların plazmalarındaki AST, ALT, ALP, MDA, GSH, CAT, SOD, GPx, Nitrit ve Nitrat; karaciğer dokularındaki MDA, GSH, CAT, SOD, GPx, Nitrit ve Nitrat düzeyleri Tablo 1'de ve Tablo 2'de gösterildi. Plazma AST, ALT, ALP ve MDA düzeyleri karaciğer toksisitesiyle beraber istatistiksel olarak anlamlı derecede artış (P<0.001), PTOE1 grubunda ise bu parametrelerde parasetamol grubuna göre anlamlı oranda azalma tespit edildi (P<0.001). Kontrol grubuna göre TOE2 ve PARA grubundaki GSH düzeyinde azalma saptandı (P<0.01). Plazma katalaz düzeylerinde özellikle bitki uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre bir artış saptandı (P<0.001). Plazma SOD (P<0.001), GPx (P<0.05) düzeyi kontrol grubuna göre PARA grubunda anlamlı olarak azalırken diğer gruplarda anlamlı olarak arttı. Nitrit düzeyinde kontrol gruba göre TOE ve PARA gruplarında genel olarak bir artış söz konusu oldu (P<0.001). Nitrat düzeyinde istatistiksel olarak anlam saptanmadı (P>0.05).

**Tablo 1.** Kontrol grubu ile TOE1, TOE2, PARA, PTOE1, PTOE2 gruplarının plazmasındaki bazı biyokimyasal parametreler (X±Sx, n:6)

	Gruplar						P
	Kontrol	TOE1	TOE2	PARA	PTOE1	PTOE2	
AST (U/L)	52.25±1.95 <sup>bc</sup>	47.67±1.567 <sup>c</sup>	57.08±0.57 <sup>bc</sup>	167.10±22.23 <sup>a</sup>	80.32±2.18 <sup>b</sup>	184.83±2.99 <sup>a</sup>	***
ALT (U/L)	44.80±1.43 <sup>e</sup>	43.35±2.05 <sup>e</sup>	54.56±0.61 <sup>d</sup>	133.47±0.45 <sup>a</sup>	77.18±0.82 <sup>c</sup>	127.59±0.76 <sup>b</sup>	***
ALP (U/L)	44.73±2.15 <sup>e</sup>	42.91±2.18 <sup>e</sup>	49.65±0.12 <sup>d</sup>	129.27±0.43 <sup>a</sup>	68.47±0.68 <sup>c</sup>	119.29±0.27 <sup>b</sup>	***
MDA (mmol/L)	10.92±0.45 <sup>c</sup>	10.30±0.28 <sup>c</sup>	11.17±0.22 <sup>c</sup>	15.27±1.19 <sup>b</sup>	10.42±0.16 <sup>c</sup>	19.20±0.72 <sup>a</sup>	***
GSH (mmol/L)	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>ab</sup>	0.17±0.01 <sup>c</sup>	0.19±0.02 <sup>bc</sup>	0.20±0.01 <sup>ab</sup>	0.22±0.01 <sup>ab</sup>	**
CAT (kU/L)	243.78±11.52 <sup>c</sup>	432.31±20.17 <sup>ab</sup>	464.58±26.46 <sup>a</sup>	379.16±25.91 <sup>b</sup>	449.44±6.81 <sup>a</sup>	453.19±1.72 <sup>a</sup>	***
SOD (U/mL)	13.69±0.13 <sup>a</sup>	13.96±0.10 <sup>a</sup>	13.83±0.14 <sup>a</sup>	12.88±0.27 <sup>b</sup>	13.96±0.14 <sup>a</sup>	14.12±0.16 <sup>a</sup>	***
GPX (U/mL)	5.89±0.12 <sup>ab</sup>	5.94±0.18 <sup>ab</sup>	5.93±0.18 <sup>ab</sup>	5.49±0.10 <sup>b</sup>	6.43±0.45 <sup>a</sup>	5.86±0.19 <sup>ab</sup>	*
NİTRİT (ppm)	0.44±0.02 <sup>c</sup>	0.45±0.01 <sup>c</sup>	0.82±0.14 <sup>b</sup>	1.26±0.02 <sup>a</sup>	0.60±0.04 <sup>c</sup>	0.55±0.04 <sup>c</sup>	***
NİTRAT (ppm)	10.59±0.26	9.89±0.15	10.93±0.34	10.95±0.39	10.23±0.20	10.47±0.28	ÖS

ÖS: P>0.05 \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 ve a, b, c, d, e: Aynı satırda farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir (P<0.05).

Karaciğer MDA düzeyi kontrol grubuna göre TOE1 ve TOE2 gruplarında anlamlı olarak arttı, PARA

grubuna göre PTOE1 ve PTOE2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı azalma saptandı

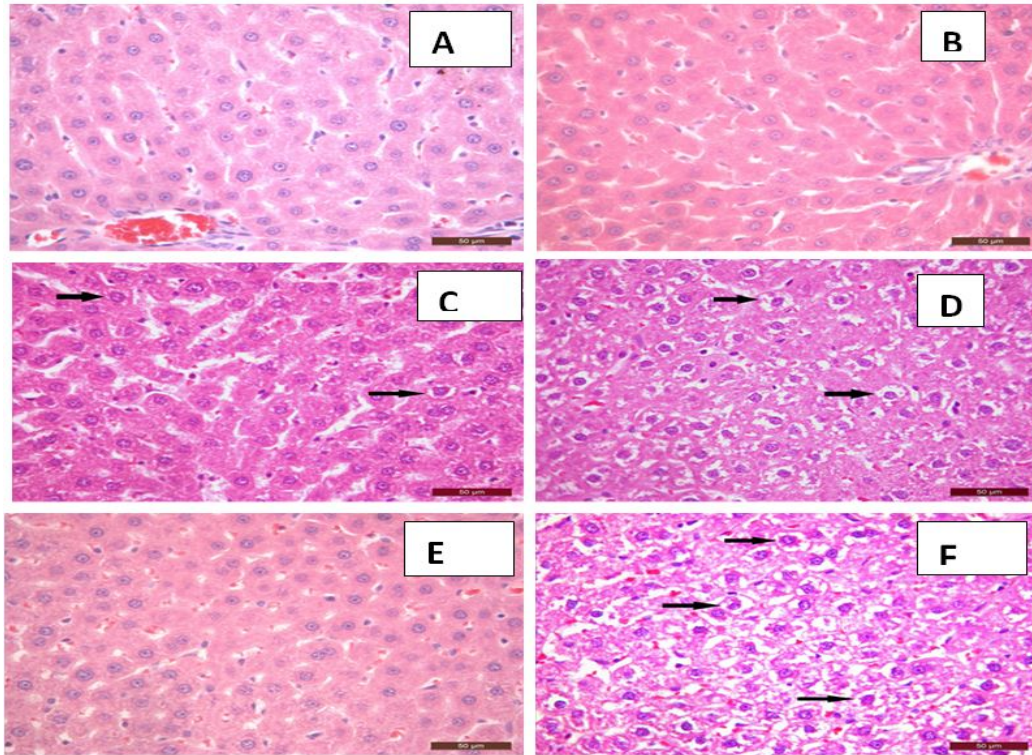
( $P<0.001$ ). GSH düzeyi TOE1, PARA, PTOE1 gruplarında kontrol grubu karşılaştırıldığında bu gruplarda azaldı ( $P<0.001$ ); TOE2, PTOE2 gruplarında artış gösterdi ( $P<0.001$ ). CAT düzeyi TOE'nin verildiği gruplarda (TOE1, TOE2, PTOE1, PTOE2) kontrol grubuna göre artış gösterdi ( $P<0.001$ ). PARA grubunda CAT düzeyi istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı ( $P<0.001$ ), PTOE1 ve PTOE2 gruplarındaki bu düzey PARA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda arttı ( $P<0.001$ ). Sadece bitki ekstraktı uygulanan gruplarda SOD enzim düzeyi kontrol grubuna göre arttı ( $P<0.001$ ),

PARA grubundaki SOD düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda azaldı ( $P<0.001$ ). GPx düzeyi TOE2, PTOE1 gruplarında kontrol grubuna göre bir artma söz konusu iken istatistiksel açıdan anlam tespit edilmedi ( $P>0.05$ ). Nitrit düzeyi TOE1, TOE2, PTOE1, PTOE2 gruplarında kontrol grubuna göre bir artma ile birlikte, PARA grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda artış tespit edildi ( $P>0.05$ ). Kontrol grubuna göre karaciğer dokusu nitrat düzeyi TOE1, TOE2, PTOE1 arttı, PARA ve PTOE2 gruplarında anlamlı oranda artış görüldü ( $P>0.05$ ).

**Tablo 2.** Kontrol grubu ile TOE1, TOE2, PARA, PTOE1, PTOE2 gruplarının karaciğer dokusundaki bazı biyokimyasal parametreler ( $X\pm Sx$ , n:6)

	Gruplar						P
	Kontrol	TOE1	TOE2	PARA	PTOE1	PTOE2	
MDA (nmol/g)	47.47 $\pm$ 3.18 <sup>c</sup>	65.02 $\pm$ 3.24 <sup>bc</sup>	86.08 $\pm$ 2.44 <sup>ab</sup>	108.50 $\pm$ 18.31 <sup>a</sup>	53.33 $\pm$ 1.90 <sup>c</sup>	58.80 $\pm$ 5.24 <sup>c</sup>	***
GSH (mmol/g)	0.43 $\pm$ 0.03 <sup>bc</sup>	0.41 $\pm$ 0.04 <sup>bc</sup>	0.60 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	0.34 $\pm$ 0.06 <sup>dc</sup>	0.46 $\pm$ 0.03 <sup>b</sup>	***
CAT (U/g)	123.70 $\pm$ 13.40 <sup>bc</sup>	239.88 $\pm$ 36.24 <sup>a</sup>	181.87 $\pm$ 21.38 <sup>b</sup>	102.65 $\pm$ 4.41 <sup>c</sup>	155.11 $\pm$ 8.67 <sup>bc</sup>	132.00 $\pm$ 11.53 <sup>bc</sup>	***
SOD (EU/mg)	7.32 $\pm$ 0.29 <sup>b</sup>	8.85 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	8.92 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>	6.94 $\pm$ 0.30 <sup>bc</sup>	7.39 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>	5.64 $\pm$ 0.94 <sup>c</sup>	***
GPX (U/mg)	10.51 $\pm$ 0.85	10.35 $\pm$ 0.67	11.20 $\pm$ 0.54	9.27 $\pm$ 0.68	1.70 $\pm$ 0.59	9.61 $\pm$ 0.93	ÖS
NİTRİT (ppm)	12.48 $\pm$ 1.04 <sup>b</sup>	12.92 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>	12.51 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>	18.99 $\pm$ 0.41 <sup>a</sup>	17.28 $\pm$ 1.35 <sup>a</sup>	18.51 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	***
NİTRAT (ppm)	76.78 $\pm$ 5.03 <sup>d</sup>	93.42 $\pm$ 1.03 <sup>cd</sup>	89.60 $\pm$ 3.33 <sup>cd</sup>	121.20 $\pm$ 6.56 <sup>b</sup>	95.52 $\pm$ 1.89 <sup>c</sup>	140.99 $\pm$ 10.49 <sup>a</sup>	***

ÖS:  $P>0.05$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  ve a, b, c, d, e: Aynı sütunda farklı harfle gösterilen ortalamalar arası fark önemlidir.



**Şekil 1.** Grupların karaciğer dokusu histopatolojisi (Hx E) Bar=50µm. (A) Kontrol grubu rat karaciğerlerinin normal histolojik yapısı (Hx E) Bar=50µm., (B) TOE1 grubu ratlarının karaciğerlerinin normal histolojik yapısı (Hx E) Bar=50µm., (C) TOE2 ratlarının karaciğerlerinde hafif hidropik dejenerasyon (Hx E) Bar=50µm., (D) PARA grubu ratlarının karaciğerlerinde şiddetli hidropik dejenerasyon (Hx E) Bar=50µm., (E) PTOE1 grubu ratlarının karaciğerlerinde çok hafif hidropik dejenerasyon (Hx E) Bar=50µm., (F) PTOE2 grubu ratlarının karaciğerlerinde çok şiddetli hidropik dejenerasyon (Hx E) Bar=50µm.

**Histopatolojik bulgular:** Kontrol, TOE1 ve PTOE1 gruplarında bulunan ratların karaciğerleri makrosko-

bik olarak koyu kahverenginde iken PARA, TOE2 ve PTOE2 gruplarındaki ratların karaciğerlerinin solgun,

genişlemiş ve kenarları küt sonlandığı görüldü. Karaciğerin histopatolojik incelemelerinde kontrol grubu ratlarında karaciğerlerin normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. TOE1 grubu ratlarının karaciğer hepatositlerinde kontrol grubu gibi normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. TOE2 ratlarının karaciğer hepatositlerinde periportal bölgelerinde hafif bir hidropik dejenerasyon gözlemlendi. PARA grubu ratlarının karaciğerlerinde hepatositlerde şiddetli diffuz hidropik dejenerasyon ve yer yer nekrotik hücrelere rastlandı. PTOE1 grubu ratlarının karaciğerlerinde çok hafif bir hidropik dejenerasyon görüldü. PTOE2 grubu ratlarının karaciğerlerinde hidropik dejenerasyon çok şiddetli olduğu belirlendi.

## Tartışma ve Sonuç

Parasetamol, asetoaminofen olarak bilinen analjezik ve antipiretik bir ilaçtır ve aşırı dozda alındığında hayvanlarda ve insanlarda hepatotoksikite ve nefrotoksikiteye neden olur (Vermeulen ve ark., 1992). Literatür verilerine göre modern tıbbın ilerlemesine ve hepatik hücrelerin rejenerasyonuna yardımcı ve karaciğeri koruyan ilaçların yaygın olmasına rağmen karaciğer hastalıklarını önlemede birçok bitki ekstraktı kullanılmaktadır (Chattopadhyay, 2003). *Dandelion* kökleri karaciğer fonksiyonlarını desteklemekte, çeşitli dermatolojik ve sistemik bozukluklarda karaciğer fonksiyonunu artırıcı ve detoksifikasyonunda kullanılan bir bitki türüdür (You ve ark., 2010). Karaciğer hasarı; karaciğer enzimleri ve oksidatif statü ile belirlenir. Karaciğer hasarının belirleyici enzimleri olması açısından önem taşıyan enzimler; AST, ALT ve ALP (Gonzalez ve ark., 2012). Parasetamol ya da başka bir toksik maddenin (CCl<sub>4</sub>, etanol vb.) vücuda alınmasıyla AST, ALT, ALP'deki önemli değişiklikler karaciğerin bütününde hasarın meydana geldiğini gösterir (Krishna ve ark., 2012). Parasetamolün oral olarak ratlara uygulanmasıyla karaciğer hasarını gösteren serum veya plazma AST, ALT, ALP enzim aktivitelerindeki önemli artış olarak kendini göstermiş bu düzeylerin toksikasyon grubu ile kontrol grubunun karşılaştırılmasında artışın söz konusu olması toksik etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (Nahida ve ark., 2011; Parmar ve ark., 2010). Bu çalışmada da toksikasyon grubunda plazma AST, ALT, ALP seviyelerinin kontrol grubuna göre yükselmesi ve verilen bitki ekstraktı ile karaciğer enzim seviyeleri karaciğerin iyileşmesinden dolayı azalması önceki çalışmalar ile uyumludur.

Ratlarda parasetamol ile hepatotoksikite oluşturulan çalışmalarda toksikasyon grubunun kontrol grubu ile karşılaştırılmasında MDA düzeyinde yükselme söz konusu olmuştur (Hoşbaş ve ark., 2011; Parmar ve ark., 2010; Sundaria ve

ark., 2013). Parasetamolle toksik hepatit oluşturulmuş ratlarda plazma MDA düzeyi kontrol grubuna göre artış gösterirken karaciğer MDA düzeyi önemli oranda artış göstermiştir (Sundaria ve ark., 2013). Parasetamol ile oluşturulan toksik hepatitte plazma ve karaciğer MDA düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Raja ve Mol, 2010; Aktaş ve ark., 2013). Yapılan farklı çalışmalar antioksidan özelliğe sahip çeşitli bitkilerin hepatoprotektif özelliklerinden yararlanılarak karaciğer hasarını tedavi edip lipid peroksidasyonunu azalttığı yönündedir (Kim ve ark., 2009; Krishna ve ark., 2012; Parmar ve ark., 2009; Rang ve ark., 2011; You ve ark., 2010). Bu çalışmada da *Taraxacum officinale*'nin çiçek, gövde ve yapraklarından elde edilen etanol ekstraktının hepatotoksikiteyi ve lipid peroksidasyonunu azalttığı saptanmıştır.

GSH; hidrojen peroksit, süperoksit radikalleri gibi radikal türleri uzaklaştırır ve membran protein tiyollerini korur. Hepatik mitokondrideki GSH tüketimi parasetamol ile oluşturulan hepatotoksikitedeki en önemli mekanizma olarak düşünülür. Parasetamol gruplarında indirgenmiş GSH seviyesinin tükenmesinin NAPQI ile GSH'ın konjugasyonundan oluşan merkapturik asitten ileri geldiği bildirilmiştir (Sumanth ve Rana, 2006). Parasetamol ile toksikite oluşturulan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında toksikite grubunda GSH düzeyinin azaldığı saptanmıştır (Parmar ve ark., 2010). Çalışmalardaki plazma ve karaciğer GSH düzeylerinin toksikasyon grubunda azalması sunulan çalışma ile uyumludur. GPx (Glutasyonperoksidaz) oksitlenmiş glutasyonu indirgenmiş glutatyonla dönüştürerek hidrojen peroksit uzaklaştırabilen ve kısmen hücre membranında bulunup selenyum içeren metaloenzimlerdendir (Jung ve Henke, 1996). Zhang ve ark. (1989)'nin çalışmasına göre karaciğer ve böbrekteki enzim aktivitesinin başka dokulara (beyin, kas) oranla daha fazla olduğunu saptamıştır. Bu çalışmada da *Taraxacum officinale* bitkisinin toprak üstü aksanından elde edilen etanol ekstraktının toksikasyon oluşturulan ratlara uygulanması sonucu plazma GPx düzeyinde istatistiksel açıdan P<0.05 oranında anlam saptanmıştır. Karaciğer GPx düzeyinde de istatistiksel olarak anlam saptanmamıştır.

CAT, zararlı hidrojen peroksidi su ve oksijene dönüştürür, yüksek oranda reaktif hidroksil radikalından dokuları korur (Chance ve Greenstein, 1992). Hücrelerde oksidatif stres oluşturan parasetamoldeki H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve oldukça yüksek olan toksik metabolitlerin birikmesiyle enzim aktivitesinde azalma meydana gelir (Pauli-Magnus ve ark., 2005). Parasetamol uygulanan çalışmada hepatotoksikite oluşturulan gruplarda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında CAT aktivitesinin düştüğü tespit edilmiştir (Parmar ve ark., 2010). Bu çalışmada da benzer

sonuçlar elde edilmiş, plazma CAT düzeyinde artış saptanırken, karaciğer CAT düzeyinde kontrol grubuna göre azalma tespit edilmiştir. TOE 200 mg/kg uygulanması CAT aktivitesini arttırarak parasetamol toksisitesinden karaciğeri koruyup aşırı miktarda serbest radikal birikimini önleyebileceği kanısına varılmıştır.

*Dandelion* yapraklarının su ekstresinin uygulandığı bir çalışmada CAT düzeyinin, *Dandelion* grubunda önemli derecede artması da bu çalışma ile örtüşmektedir (Cho ve ark., 2003). Bir başka çalışmada *Taraxacum officinale*'nin kök eksteresini 250-500 ve 750 mg/kg olmak üzere üç ayrı dozda uygulamasına rağmen karaciğer dokusunda GSH ve CAT düzeylerinde hiçbir grupta herhangi bir önem saptanmamıştır (Plant ve Karaj, 2010). Fakat bu çalışmada CAT düzeyi plazma ve karaciğerde  $P<0.001$  düzeyinde önemli bulunmuştur. Bunun sebebinin *Taraxacum officinale* köklerinin flavanoid ve antioksidan maddelerinden fakir olmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Szymonik-Lesiuk ve ark. (2003) çalışmasında  $CCl_4$  ile oluşturduğu toksisitede SOD düzeyi hafif bir yükselme ile birlikte önem saptanmamışken, Domitrovich ve ark. (2010)'na göre toksisite oluşturulan grup, kontrol grubuyla karşılaştırıldığı zaman serum SOD düzeyinde önemli derecede artış tespit edilmiştir. Yapılan çalışma çoğu araştırma ile benzer şekilde sonuçlanmış, karaciğer ve plazma SOD düzeylerindeki artışın  $P<0.001$  düzeyinde öneme sahip olduğu saptanmıştır.

Luteolin ve luteolin 7-O-glukozid'den oluşan iki flavonoid bileşiği *Taraxacum officinale*'nin etilasetat fraksiyonunda zengin olup nitrik oksit sentaz (iNOS) enziminin uyarılmasını ve nitrik oksit üretimini baskılar (Hu ve Kitts, 2004). Colle ve ark. (2012)'nin araştırmasına göre farelerde Parasetamol ile oluşturulan toksik hepatitte *Taraxacum officinale* yaprakları 2.2-difenil-1-pikrilhidrazil ve nitrik oksit radikallerine karşı temizlemesinin yanında antioksidan aktivite göstermiştir. Bu çalışmada da nitrat ve nitrit değerleri için bu sonuçlara benzer sonuçlar bulunmuştur. Genel olarak toksikasyon grubunda kontrole göre bir yükselişin olduğu söz konusu iken TOE gruplarında bu değerlere göre bir düşüş söz konusu olmuştur.

Bu çalışmada histopatolojik olarak Al-Malki ve ark. (2013)'nin yaptığı çalışmalara çok benzer sonuçlar bulunmuştur. *Dandelion* yapraklarının su ekstraktının (0.5 ve 2 g/kg) kullanıldığı gruplarda bu ekstraktın hepatotoksositeye karşı koruma sağladığı belirtilmiştir. Başka çalışmalarda da toksisite oluşturulan grupların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; hepatositlerde şişkinlik ve nekrozun gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Sonuç olarak ratların karaciğerinde parasetamol ile toksikasyon oluşturarak antioksidan savunma sistemlerinin zayıflatılmasıyla *Taraxacum officinale* bitkisinin toprak üstü aksanından elde edilen etanol ekstraktının biyokimyasal parametreler ve histopatolojik bulgulara göre 200 mg/kg uygulanan miktarı parasetamol ile oluşturulan hepatotoksosite ve karaciğer üzerine olumlu etkilerinin olduğu; *T. officinale* ekstraktının 250 mg/kg uygulanan miktarı ise ratlar üzerinde toksik etki yaparak lipid peroksidasyonu arttırdığı, antioksidan enzim düzeylerini önemli oranda azaltması nedeniyle toksik etkisinin olduğu belirlendi. Elde edilen ekstraktın biyokimyasal ve histopatolojik parametreler üzerine etkilerinin tesbiti literatüre öncül çalışma olarak sunulurken karaciğerdeki hasarı düzeltmek için ekstraktın farklı sürelerde ve yan etki oluşturmaksızın en iyi sonucu verecek farklı dozlarının da kullanılarak etkilerinin belirlenmesi konusunda yeni araştırmalara ihtiyaç olduğu kanaatine varıldı.

## Kaynaklar

- Adam B, 2012: Yiğitoğlu R. Tıbbi Biyokimya, 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 189-249.
- Aktaş Ö, Eskiocak S, Özgün GS, Yalçın Ö, Süt N, 2013: Asetaminofen ile toksik hepatit oluşturulan ratlarda L-karnitinin etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi*, 38, 475-482.
- Al-Malki Abdulrahman L, Abo-Golayel MK, 2013: Hepatoprotective Efficacy of Chicory alone or combined with Dandelion leaves against induced liver damage. *Life Science Journal*, 10(4), 140-157.
- Albayrak A, 2013: Serotonin-7 reseptörlerinin parasetamol ile indüklenen deneysel karaciğer toksisitesindeki yeri ve önemi. Türk Farmakoloji Derneği Farmakoloji Eğitiminde Kuşaklararası Bilimsel Etkileşme Seminerleri Programı, Bursa.
- Anonim, 2013a: <http://www.naturalfoodbenefits.com/display.asp?CAT=2&I=120>. Natural food benefits, Erişim tarihi; 20.09.2013.
- Anonim,2013b:<http://www.naturallifemagazine.com/1204/dandelions.htm>. Natural life magazine, Erişim tarihi; 20.09.2013.
- Ball CR, 1996: Estimation and identification of thiols in rat spleen after cysteine or glutathione treatment pelevance to protection against nitrogen mustards. *Biochemical Pharmacology*, 15, 809-816.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier D, 2007: Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry. Çeviri: Ulukaya E. Biyokimya, 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
- Chance B, Greenstein DS, 1992: The mechanism of catalase actions-steady state analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 37, 301-339.
- Chattopadhyay RR, 2003: Possible mechanism of hepatoprotective activity of *Azadirachta indica* leaf extract: part II. *Journal of Ethnopharmacol*, 89, 217-219.

- Cho SY, Oh YJ, Park J, 2003: Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 2, 458-463.
- Colle D, Arantes LP, Gubert P, Luz SCA, Athayde ML, Rocha JBT, Soares FAA, 2012: Antioxidant properties of *Taraxacum officinale* leaf extract are involved in the protective effect against hepatotoxicity induced by acetaminophen in mice. *Journal of Medicinal Food*, 15, 549-556.
- Davis PH, 1965: Flora of Turkey and The East Aegea Islands, Edinburgh, The University Press.
- Domitrović R, Jakovac H, Romić Ž, Rahelić D, Tadić Ž, 2010: Antifibrotic activity of *Taraxacum officinale* root in carbon tetrachloride-induced liver damage in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 130, 569-577.
- Fernandez V, Videla LA, 1981: Effect of acute and chronic ethanol ingestion on the content of reduced glutathione of various tissues of the rat. *Experientia*, 37, 392-394.
- Fortea MI, Lopez-Miranda S, Serrano-Martinez A, Carreno BJ, Nunez-Delgado E, 2009: Kinetic characterisation and thermal inactivation study of polyphenol oxidase and peroxidase from table grape (Crimson Seedless). *Food Chemistry*, 113, 1008-1014.
- Gallaher RN, Gallaher K, Marshall AJ, 2006: Mineral analysis of ten types of commercially available tea. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 53-57.
- Gonzalez-Castejon M, Visioli F, Rodriguez-Casado A, 2012: Diverse biological activities of dandelion. *Nutrition Reviews*, 70, 534-547.
- Goth L, 1991: A simple method for determination of serum catalase activity and revision of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica Chimica Acta*, 196, 143-152.
- Hoşbaş S, Hartevioğlu A, Pekcan M, Deliorman Orhan D, 2011: Assessment of hepatoprotective activity of *Achillea biebersteinii* ethanol extract on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36, 33-39.
- Hu C, Kitts DD, 2004: Luteolin and luteolin-7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 265, 107-113.
- Jaeschke H, Bajt LM, 2006: Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicological Sciences*, 89, 31-41.
- Jung K, Henke W, 1996: Developmental changes of antioxidant enzymes activity in kidney and liver from rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 613-617.
- Kayaalp O, 2005: Analjezikler: Tibbi Farmakoloji. İçinde: Lippincott: Analgesic Application, 7.Baskı, Ankara, 223-245.
- Kim MY, Cheong SH, Kim MH, Son C, Yook HS, Sok DE, Cho JHK, Chun H, Kim MR, 2009: Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet. *Journal of Medicinal Food*, 12, 877-884.
- Koç H, 2002: Doğrudan, doğadan bitkilerle sağlıklı yaşama. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölüm Yayını, Tokat, Ümit Ofset.
- Kordali Ş, Çakır A, Akcin TA, Mete E, Akcin A, Aydın T, Kılıç H, 2009: Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). *Industrial Crops and Products*, 29, 562-570.
- Krishna A, Chaitanya D, Siva RC and Manohar RA, 2012: Hepatoprotective effect of biherbal ethanolic extract against paracetamol-induced hepatic damage in albino rats. *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 198.
- Kuntz E, Kuntz HD, 2008: Hepatology Textbook and Atlas, 3<sup>rd</sup> ed. Germany, Springer Press.
- Matkovic B, Szabo L, Varga IS, 1988: Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Laboratoriumi Diagnosztika*, 15, 248-249.
- Nahida T, Qazi MA, Shah A, 2011: Curative activity of ethanol extract of *Taraxacum officinale* weber. against CCl<sub>4</sub> induced hepatocellular damage in albino rats. *Journal of Pharmacy Research*, 4,3, 687-689.
- Parmar SR, Dave GS, Patel HV, Kiran K, 2009: Hepatoprotective value of some plants extract against carbon tetrachloride toxicity in male rats. *Journal of Cell and Tissue Research*, 9, 1737-1743.
- Parmar SR, Vashrambhai PH, Kalia K, 2010: Hepatoprotective activity of some plants extract against paracetamol induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Herbal Medicine and Toxicology*, 4, 101-106.
- Pauli-Magnus C, Stieger B, Meier Y, Kullak-Ublick GA, Meier PJ, 2005: Enterohepatic transport of bile salts and genetics of cholestasis. *Journal of Hepatology*, 43, 342-357.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC, 1966: Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical Biochemistry*, 16, 359-364.
- Plants A and Karaj I. The effects of *Taraxacum officinale* L. and *Berberis vulgaris* L. root extracts on carbon tetrachloride induced liver toxicity in rats. *Journal of Medicinal Plants*, 2010.
- Raja B, Mol SD, 2010: The protective role of vanillic acid against acetaminophen induced hepatotoxicity in rats. *Journal of Pharmacy Research*, 1480.
- Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G, 2011: Rang & Dale's Pharmacology. 7<sup>th</sup> ed. Elsevier Churchill Livingstone, An imprint of Elsevier Ltd., Spain, 698-709.
- Sigstedt SC, Hooten CJ, Callewaert MC, Jenkins AR, Romero AE, Pullin MJ, Kornienko A, Lowrey TK, Slambrouck SV, Steelant WF, 2008: Evaluation of aqueous extracts of *Taraxacum officinale* on growth and invasion of breast and prostate cancer cells international journal of oncology. *International Journal of Oncology*, 32, 1085-1090.
- Stahr HM, 1977: Analytical Toxicology Methods Manual. Ames-Iowa, USA, Iowa State Univ. Press.



- Sumanth M, Rana AC, 2006: In vivo antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Taraxacum officinale* roots in rats. *Indian Journal of Pharmacology*, 38, 54.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y, 1988: A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry*, 34, 497-500.
- Sundaria K, Karthik D, Ilavenil S, Kaleeswaran B, Sriganesh S, Ravikumar S, 2013: Hepatoprotective and proteomic mechanism of *Sphaeranthus indicus* in paracetamol induced hepatotoxicity in wistar rats. *Food Bioscience*, 57-65.
- Sümbüloğlu V, Sümbüloğlu K, 1998: Sağlık Bilimlerinde Araştırma Yöntemleri. 2. Baskı. Ankara, Hatiboğlu Yayınları.
- Szymonik-Lesiuk S, Czechowska G, Stryjecka-Zimmer M, Slomka M, Maldro A, Celinski K, Wielosz M, 2003: Catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activities in various rat tissues after carbon tetrachloride intoxication. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, 309-315.
- Tietze F, 1969: Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Analytical Biochemistry*, 27, 502-522.
- Vermeulen NPE, Bessems JGM, Vandestreat R, 1992: Molecular aspects of paracetamol-induced hepatotoxicity and its mechanism based prevention. *Drug Metabolism Reviews*, 24, 367-407.
- Yoshioka T, Kawada K, Shimada T, 1979: Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanism against activated-oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 135, 372-376.
- You Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, Oh KT, Lee J, Cho HY, Jun W, 2010: In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1632-1637
- Zhang L, Maiorino M, Roveri A, Ursini F, 1989: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase: specific activity in tissues of rats of different age and comparison with other glutathione peroxidases. *Biochim Biophys Acta*, 1006, 140-143.
- \*\* : Bu çalışma Yüksek Lisans tezinden özetlenmiş olup, çalışmanın özeti 7. Ulusal Veteriner Biyokimya ve Klinik Biyokimya Kongresinde poster olarak sunulmuştur
- \*Yazışma Adresi:** Betül APAYDIN YILDIRIM  
Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.  
e-mail: betul\_apaydin@hotmail.com

# Sığırlarda Ahır Zemin Tiplerinin Ayak Hastalıkları ve Tırnak Deformasyonları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Mehmet Cengiz HAN, Aydın SAĞLIYAN, Eren POLAT\*

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.

Geliş Tarihi: 24.10.2016

Kabul Tarihi: 24.11.2016

**Özet:** Bu saha çalışmasında farklı tipteki ahır zeminlerinin sığır ayak hastalıkları ve tırnak deformasyonları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Araştırma Muş ve yöresinde rastgele seçilen 81 ahırda yürütüldü. Bu ahırlarda barındırılan farklı yaş, ırk, ağırlık ve cinsiyetteki toplam 1292 sığır materyal olarak kullanıldı. Bu ahırların zemin yapılarının tiplerine göre hayvanlarda görülen ayak hastalıkları ve tırnak deformasyonları oranları saptandı. Yapılan çalışmada elde edilen veriler ahır zemin tiplerinin sığır ayak hastalıkları ve tırnak deformiteleri üzerine önemli etkilerinin olduğu görülmüştür. İncelenen bu 81 ahırda beton zeminli barınaklarda %32.97, taş zeminli barınaklarda %8.51, tahta zeminli barınaklarda %5.57, kauçuk zeminli barınaklarda %6.66, toprak zeminli barınaklarda ise %46.28 olarak ayak hastalıkları ve tırnak deformiteleri tespit edilmiştir. SPSS for Windows 21.0 (IBM) Descriptive Statistics Analysis Crosstabs metoduyla Chi-Square testi kullanılarak, barınak zemin tiplerinin (beton, taş, tahta, kauçuk, toprak) yetiştirilen sığırların ayak hastalıkları ve tırnak deformasyonları üzerine olan etkilerinin araştırılması yönünden analizi yapıldı. Ulaşılan sonuçların ışığı altında  $P<0.05$  ve  $P<0.01$  aralıkları çalışma verileri açısından anlamlı olarak kabul edildi.

**Anahtar Kelimeler:** Ayak Hastalıkları, Barınak zemini, Sığırlar.

## Investigation of Cattle in the Diseases of Stable Ground Foot Type and Nail on the Effects of Deformation

**Abstract:** This area of the barn floor in different types of work aimed to investigate the effects of foot diseases and nail deformation. Research, Mush and the region was carried out in 81 randomly selected in the barn. It is hosted in the stables of different ages, races, a total of 1292 cattle were used as material in weight and gender. This is based on the types of barn floor structure revealed foot diseases and nail deformation rates in animals. The data obtained in the studies has been shown to have a significant effect on the cattle disease foot and nail deformities of barn flooring types. Investigation of the 81 in the shelter, concrete floors in the barn %32.97, stone floors in shelters %8.51, wood floors in shelters %5.57, %6.66 in rubber flooring shelter, and in earth-floored shelter foot diseases and nail deformities as %46.28 were identified. SPSS for Windows 21.0 (IBM) using Descriptive Statistics Analysis Crosstabs method with Chi-Square test, shelter floor types (concrete, stone, wood, rubber, earth) grown cattle foot disease and were analyzed in terms of the investigation of the effects on the nail deformation. In the light of the results  $P<0.05$  and  $P<0.01$  were considered significant in terms of the range of trial data.

**Keywords:** Foot Diseases, Shelter Floor, Cattle.

## Giriş

Tırnak hastalıklarının dünya üzerindeki tüm sığırlarda sıklıkla görüldüğü ve sığırlarda görülen topallıkların %90'ının tırnak ve ayak hastalıklarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Weaver, 2000). Ayrıca sığırlarda topallıklar geniş ölçüde ekonomik kayıplara neden olan bir problem olarak tanımlanmaktadır (Vermuntand ve Greenough, 1996). Topallıkların bakım şartları, beslenme, yaş, genetik, canlı ağırlık, laktasyon, hayvanın özellikleri ve barınak dizaynı arasındaki etkileşim sonucunda meydana gelen multifaktöryel şartlarla karakterize olduğu ifade edilmektedir (Clarkson ve ark., 1993; Hedges ve ark., 2000). Ayrıca zemin yüzeyinin direk olarak tırnak sağlığı ve hayvanın hareketleri üzerinde etkili bir faktör olduğu vurgulanmaktadır (Albright, 1995).

Süt sığırlarında çevresel faktörlerin özellikle de ahır zemin yapısının topallıkların oluşmasında belirleyici bir faktör olduğu bildirilmektedir (Cook ve ark., 2004). Kötü ahır zeminleri sığırlar da eksternal travmalar, laminitis, solea hemorajileri, solea ülseri, beyaz çizgi ayrılmaları, ökçe ezilmesi, tırnak çatlağı gibi lezyonları tetikleyici faktörlerden birisi olarak kabul edilmektedir (Chesterton, 1989; Cookand Nordlund, 2009). Beton zeminlerin sert oluşu ve aşındırıcı etkisi tırnağın boynuz kısmını daha hızlı aşınmasına yol açar (Vermuntand ve Greenough, 1995). Buna bağlı olarak da ayak lezyonları ve topallıklar ortaya çıkmaktadır (Bergsten ve Frank, 1996; Van Amstel ve ark., 2004). Yumuşak malzeme kullanılan ahır zeminleri ayaklar üzerine uygulanan basıncı azaltır (Hinterhofer ve ark., 2005). Bazı araştırmacılar ayak lezyonlarını

azaltmak için saman altlıklı ahırları ve kauçuk paspas kullanımını önermektedirler (Benz, 2002; Somers ve ark., 2003).

Yapılan çalışmalar yumuşak zeminli ahırlarda sert zeminli ahırlara göre daha az tırnak lezyonlarının meydana geldiğini göstermiştir. Son yıllarda süt sığırcılığı ahırlarında kauçuk zemin kullanımı sert zeminlere alternatif olarak incelenmektedir (Bell ve Huxley, 2009; Vanegas ve ark., 2006). Ancak bazı araştırmacılar kauçuk zeminlerin ayak sağlığı üzerine olumsuz etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir (Boyle ve ark., 2007; Krebs ve ark., 2011; Kremer ve ark., 2007). Ahır zemininde ahşap yapı kullanımı ayaklar üzerinde daha fazla basınca neden olabilir (Hinterhofer ve ark., 2006). Bazı araştırmacılar ahşap zeminlerin zemindeki gübrenin nemini azalttığını ve sığırların toynaklarında kurumaya neden olduğunu vurgulamışlardır (Telezhenko ve Bergsten, 2005). Yine yapılan araştırmalarda barınak zemininde kum kullanılan sürülerin ayak hastalıklarının prevalansında önemli ölçüde azalma olduğunu gözlemlemiştir (Cook, 2003).

Bu çalışmada, Muş yöresinde farklı zeminlere sahip ahırlar da barındırılan sığırlarda meydana gelen ayak hastalıkları ve tırnak deformiteleri üzerine barınak zeminlerinin etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini; hayvan popülasyonunun yoğun olduğu Türkiye-Muş yöresinin farklı bölgelerindeki 81 ahır ve değişik yaş, ırk, cinsiyet ve ağırlıkta toplam 1292 baş sığır oluşturdu. İncelenen bu ahırların zeminlerinin beton zemin (n=426 sığır), taş zemin (n=110 sığır), tahta zemin (n=72 sığır), kauçuk zemin (n=86 sığır), toprak zemin (n=598 sığır) olduğu tespit edilmiştir.

Bu 81 ahırın barınak şartlarının uygunluğu, ahırların zemin yapısı incelendi. Hayvan sahiplerinden sığırlarda ayak hastalıklarının ve tırnak deformitelerinin görülme sıklığına yönelik anemnez alındı. Hayvanlar ayak hastalıkları yönünden ayakta dururken ve yürütülürken muayene edildi. Ayak ve tırnak yapısı incelenerek hayvanın cüssesine uygunluğu, tırnak deformasyonları, ökçe ve taban bölgesindeki bozukluklar, interdijital bölge hastalıkları ve corona bölgesindeki bozuklukların varlığı araştırıldı. Elde edilen tüm veriler kullanılmak üzere kayıt altına alındı. Çalışma sonunda tutulan veri kayıtları daha sorasında kullanılmak üzere sürü gözlem kayıt formlarına işlenerek arşivlendi. Tutulan kayıtlar değerlendirilmek üzere istatistik

metotlarından SPSS for Windows 21.0 (IBM) Descriptive Statistics Analysis Crosstabs metoduyla Chi-Square testi kullanılarak, barınak zemin tiplerinin (beton, taş, tahta, kauçuk, toprak) yetiştirilen sığırların ayak hastalıkları ve tırnak deformasyonları üzerine olan etkilerinin araştırılması yönünden analizi yapıldı. Ulaşılan sonuçların ışığı altında  $P<0.05$  ve  $P<0.01$  aralıkları çalışma verileri açısından anlamlı olarak kabul edildi.

## Bulgular

Çalışmada incelenen ahırlarda havalandırma sistemlerinin yetersiz olduğu (%18.51) veya hiç bulunmadığı (%13.58); buna bağlı olarak da barınak ortamında yoğun bir amonyak ve gaita kokusunun varlığı tespit edildi. Araştırmanın yapıldığı işletmelere ait barınakların zeminlerinin beton zemin (%20.99), taş zemin (%11.11), tahta zemin (%9.88), kauçuk zemin (%2.46), toprak zemin (%55.56) olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca barınak zeminlerinde dışkı ve idrar kanallarının yapılmaması (%11.11) veya yetersiz / uygunsuz yapılması (%20.99) nedeniyle, idrar ve dışkının barınak zemininde biriktiği, hayvanların özellikle arka ayaklarının gaita ve idrar birikintileri içerisinde kaldığı belirlendi. Özellikle toprak ve tahta zeminli barınaklarda bu olguya sıkça rastlanıldı. Yine toprak ve beton zeminli barınakların zeminlerinde oluşan çukurlarda idrar ve gaita birikintilerine rastlanıp bunların temizlemede problem oluşturduğu izlendi. Çalışmada ahır zeminlerine göre tırnaklarda deformite ve ayak hastalıkları oranları beton zeminli barınaklarda %32.97, taş zeminli barınaklarda %8.51, tahta zeminli barınaklarda %5.57, kauçuk zeminli barınaklarda %6.66, toprak zeminli barınaklarda ise %46.28 olarak tespit edilmiştir.

Sığırların barınak zeminlerine göre tırnaklarında görülen deforme tırnak yapılarının oranları; beton zeminli barınaklarda barındırılan hayvanlarda %1.88 küt tırnak, %1.64 makas tırnak, %3.52 sivri tırnak, %1.41 ayrık tırnak, %1.41 yayvan ve dolgun tırnak, %1.88 burulmuş tırnak olarak saptanmıştır. Taş zeminli barınaklarda ise; %3.64 küt tırnak, %2.73 makas tırnak, %7.27 sivri tırnak, %4.55 ayrık tırnak, %3.64 yayvan ve dolgun tırnak, %3.64 burulmuş tırnak olarak gözlemlenmiştir. Tahta zeminli barınaklarda bu oranlar; %2.78 küt tırnak, %5.56 makas tırnak, %6.94 sivri tırnak, %2.78 yayvan ve dolgun tırnak, %5.66 burulmuş tırnak olarak bulunmuş, ayrık tırnak olgusuna ise rastlanmamıştır. Kauçuk zeminli barınaklarda; %1.16 oranında küt tırnak olgusu saptanmış, diğer

tırnak deformiteleri gözlemlenmemiştir. Toprak zeminli barınaklarda ise; %1.84 küt tırnak, %3.55 makas tırnak, %6.35 sivri tırnak, %3.68 ayırık tırnak, %3.01 yayvan ve dolgun tırnak, %3.17 burulmuş tırnak saptanmıştır. Yapılan çalışmada ahır zeminlerine göre tırnak deformitelerine ilişkin veriler Tablo 1'de, ayak hastalıklarına

ilişkin veriler ise Tablo 2'de gösterilmiştir. Farklı ahır zemin tiplerinin tırnak deformasyonları üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; saptanan verinin  $P < 0.0019$  olarak bulunması, ahır zemin tipleri ile tırnak deformasyonları arasında anlamlı bir ilişkinin olacağı kanısına varılmıştır.

**Tablo 1.** Barınak zeminlerine göre sığırların ayaklarında görülen tırnak deformasyonlarının dağılımı

Barınak Zemini Tipleri	Deforme Tırnak Yapıları						Deformasyonsuz	Toplam
	Küt Tırnak	Makas Tırnak	Sivri Tırnak	Ayrık Tırnak	Yayvan ve Dolgun Tırnak	Burulmuş Tırnak		
<b>Beton</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	8	7	15	6	6	8	376	426
Barınak Zemini (%)	1.88	1.64	3.52	1.41	1.41	1.88	88.26	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	30.77	18.92	22.73	18.18	20.00	19.51	35.51	32.97
<b>Taş</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	4	3	8	5	4	4	82	110
Barınak Zemini (%)	3.64	2.73	7.27	4.55	3.64	3.64	74.55	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	15.38	8.11	12.12	15.15	13.33	9.76	7.74	8.51
<b>Tahta</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	2	4	5	0	2	4	55	72
Barınak Zemini (%)	2.78	5.56	6.94	0.00	2.78	5.66	76.39	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	7.69	10.81	7.58	0.00	6.67	9.76	5.19	5.57
<b>Kauçuk</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	1	0	0	0	0	0	85	86
Barınak Zemini (%)	1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	98.84	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	3.85	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.03	6.66
<b>Toprak</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	11	23	38	22	18	25	461	598
Barınak Zemini (%)	1.84	3.85	6.35	3.68	3.01	4.18	77.09	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	42.31	62.16	57.58	66.67	60.00	60.98	43.53	46.28
<b>Toplam</b>								
Hayvan Sayısı (adet)	26	37	66	33	30	41	1059	1292
Barınak Zemini (%)	2.01	2.94	5.11	2.55	2.32	3.17	81.97	100.00
Deforme Tırnak Yapıları (%)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

**Tablo 2.** Barınak zeminlerine göre sığırların ayaklarında görülen ayak hastalıklarının dağılımı

Barınak zemin tipleri	Hastalıklar								Sağlıklı	Toplam
	Tırnak erezyonu	Ökçe apsisi	İnterdigital hiperplazi	İnterdigital flegmon	Pododermatit izeptica diffuza	Digital dermatitis	Beyaz çizgi hastalığı	Ökçe ve taban eziği		
<b>Beton</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	9	4	3	2	8	3	5	7	385	426
Barınak Zemini (%)	2.11	0.94	0.7	0.47	1.88	0.70	1.17	1.64	90.38	100.00
Hastalıklar (%)	26.47	17.39	25.00	11.76	36.36	25.00	20.00	17.95	34.75	32.97
<b>Taş</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	1	3	2	2	1	1	4	5	91	110
Barınak Zemini (%)	0.91	2.73	1.82	1.82	0.08	0.08	3.64	4.55	82.73	100.00
Hastalıklar (%)	2.94	13.04	16.67	11.76	4.55	8.33	16.00	12.82	8.21	8.51
<b>Tahta</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	2	1	1	2	2	2	1	2	59	72
Barınak Zemini (%)	2.78	1.39	1.39	2.78	2.78	2.78	1.39	2.78	81.94	100.00
Hastalıklar (%)	5.88	4.39	8.33	11.76	9.09	16.67	4.00	5.13	5.32	5.57
<b>Kauçuk</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	0	0	0	0	1	1	0	0	84	86
Barınak Zemini (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	1.16	1.16	0.00	0.00	97.67	100.00
Hastalıklar (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	4.55	8.33	0.00	0.00	7.58	6.66
<b>Toprak</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	22	15	6	11	10	5	15	25	489	598
Barınak Zemini (%)	3.68	2.51	1.00	1.84	1.67	0.84	2.51	4.18	81.77	100.00
Hastalıklar (%)	64.71	65.22	50.00	64.71	45.45	41.67	60.00	64.10	44.13	46.28
<b>Toplam</b>										
Hayvan Sayısı (adet)	34	23	12	17	22	12	25	39	1108	1292
Barınak Zemini (%)	2.63	1.78	0.93	1.32	1.70	0.93	1.93	3.02	85.76	100.00
Hastalıklar (%)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

Yapılan çalışmada sığırlar, barınak zeminlerine göre ayak hastalıkları yönünden incelendiğinde; beton zeminli barınaklarda ökçe erezyonu %2.11, ökçe apsesi %0.94, interdigital hiperplazi %0.70, interdigital flegmon %0.47, Pododermatitis aseptica diffusa %1.88, digital dermatitis %0.70, beyaz çizgi hastalığı %1.17, ökçe ve taban eziği %1.64 oranında olduğu tespit edilmiştir. Taş zeminli barınaklarda; ökçe erezyonu %0.91, ökçe apsesi %2.73, interdigital hiperplazi %1.82, interdigital flegmon %1.82, Pododermatitis aseptica diffusa %0.08, digital dermatitis %0.08, beyaz çizgi hastalığı %3.64, ökçe ve taban eziği %4.55 olarak saptanmıştır. Tahta zeminli barınaklarda; ökçe erezyonu %2.78, ökçe apsesi %1.39, interdigital hiperplazi %1.39, interdigital flegmon %2.78, pododermatitis aseptica diffusa %2.78, digital dermatitis %2.78, beyaz çizgi hastalığı %1.39, ökçe ve taban eziği %2.78 olarak gözlemlenmiştir. Kauçuk zeminli barınaklarda; pododermatitis aseptica diffusa %1.16, ve digital dermatitis %1.16 olarak bulunmuş diğer hastalıklara rastlanmamıştır. Toprak zeminli barınaklarda ise bu oranlar; ökçe erezyonu %3.68, ökçe apsesi %2.51, interdigital hiperplazi %1.00, interdigital flegmon %1.84, pododermatitis aseptica diffusa %1.67, digital dermatitis %0.84, beyaz çizgi hastalığı %2.51, ökçe ve taban eziği %4.18 tespit edilmiştir. Farklı barınak zemin tiplerinin ayak hastalıkları üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu çalışmada; saptanan verinin  $P < 0.0052$  olarak bulunması, referans noktası çerçevesinde barınak zemin tipleri ile ayak hastalık arasında anlamlı bir ilişkinin olacağı düşünülmüştür.

## Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmalarda farklı barınak zemin tiplerinin ayak hastalıkları ve tırnak yapılarını etkilediği bildirilmiştir (Benz, 2002; Haufe ve ark., 2012; Kremer ve ark., 2007; Vokey ve ark., 2001). Yapılan bir başka çalışmada beton zeminli barınaklarda yetiştirilen sığırların ayaklarında görülen hastalıkların prevalansını %19.8, toprak zeminli barınaklarda yetiştirilen sığırlarda ise %2.9 olarak tespit etmişlerdir (Fayeand ve Lescourret, 1989). Birçok araştırmacı sert barınak zemin yüzeyinin ayak tabanında çeşitli hastalıklara yol açan etken olduğunu kabul etmiştir (Barker ve ark., 2009; Kenneth ve ark., 2004; Nordlund ve ark., 2004). Yaptığımız bu saha çalışması sonrasında, barınakların zemin tiplerine göre, sığırların ayaklarındaki deforme tırnak ve hastalık oranları beton zeminli barınaklarda %32.97, taş zeminli barınaklarda %8.51 olarak bulunmuştur. Bu oranlar tahta

zeminli barınaklarda %5.57 iken kauçuk zeminli barınaklarda %6.66, toprak zeminli barınaklarda ise %46.28 olarak tespit edilmiştir. Toprak ve beton zeminli barınaklarda barındırılan hayvanlarda deforme tırnak yapılarının ve ayak hastalıklarının fazla görülme nedeni; bu zeminlerde yetiştirilen hayvanlara tırnak bakımlarının yetersiz ya da hiç yapılmaması ve sığır popülasyonunun %55.56'sının toprak, %20.99'unun beton zemine sahip barınaklarda yetiştirilmesinin etken olabileceği düşünülmüştür.

Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda farklı barınak zeminlerinde tutulan hayvanların tırnaklarının boyutlarında farklılıklar olduğunu buna bağlı olarak deforme tırnak yapılarının olduğunu tespit etmişlerdir (Andersson ve Lundström, 1981). Ayrıca farklı barınak zeminlerinde boynuz tırnaktaki büyüme oranlarındaki farklılık sebebiyle özellikle medial ve lateral tırnak arasında boyut farklılıklarından dolayı deforme tırnak yapılarının varlığından bahsedilmektedir (Tranterand ve Morris, 1992). Bu çalışmada; ahır zeminlerine göre sığırların tırnaklarında görülen deforme tırnak yapılarının oranları; beton zeminli barınaklarda barındırılan hayvanlarda %1.88 küt tırnak, %1.64 makas tırnak, %3.52 sivri tırnak, %1.41 ayırık tırnak, %1.41 yayvan ve dolgun tırnak, %1.88 burulmuş tırnak olarak saptanmıştır. Taş zeminli barınaklarda ise; %3.64 küt tırnak, %2.73 makas tırnak, %7.27 sivri tırnak, %4.55 ayırık tırnak, %3.64 yayvan ve dolgun tırnak, %3.64 burulmuş tırnak olarak gözlemlenmiştir. Tahta zeminli barınaklarda bu oranlar; %2.78 küt tırnak, %5.56 makas tırnak, %6.94 sivri tırnak, %2.78 yayvan ve dolgun tırnak, %5.66 burulmuş tırnak olarak bulunmuş, ayırık tırnak olgusuna ise rastlanmamıştır. Kauçuk zeminli barınaklarda; %1.16 oranında küt tırnak olgusu saptanmış, diğer tırnak deformeiteleri gözlemlenmemiştir. Toprak zeminli barınaklarda ise; %1.84 küt tırnak, %3.55 makas tırnak, %6.35 sivri tırnak, %3.68 ayırık tırnak, %3.01 yayvan ve dolgun tırnak, %3.17 burulmuş tırnak saptanmıştır. Tırnak deformeitelerinin tespit edildiği barınaklarda barınak zeminin kirli olmasının, hayvanların tırnak bakımlarının ve kesimlerinin düzenli yapılmamasının, hayvanların uzun süre barınak ortamında tutularak dışarı çıkarılıp gezdirilmemesinin etken olabileceği düşünüldü.

Bazı araştırmacılar ahşap zeminli barınaklarda daha fazla burulmuş tırnak olgularına rastlandığını ifade etmiştir (Fjeldaas ve ark., 2010). Bazı araştırmacılar yaptıkları çalışmada barınak yüzeyi ile tırnak arasında bir ilişkinin olduğunu, sert ve aşındırıcı özelliğe sahip beton zeminlerin tırnağın boynuz tabakasını aşındırdığını ifade

etmişlerdir (Vermunt ve Greenough, 1995). Bazı araştırmacılara beton zeminli barınaklardaki hayvanlarda solea hemoraji, solea ülseri, beyaz çizgi hastalığı gibi hastalıkların toprak zeminli barınaklarda barındırılanlara oranla daha fazla görüldüğünü belirtmişlerdir (Franck ve ark., 2008; Frankena ve ark., 1992).

Yapılan bir araştırmada ahşap, beton, kauçuk gibi farklı barınak zemin sistemlerinde tutulan sığırların tırnaklarında ökçe erezyonu, interdigital dermatit, solea hemorajisi, digital dermatitis, interdigital hiperplazi gibi ayak hastalıklarının görüldüğü bildirilmiştir (Somers ve ark., 2003). Fjeldaas ve ark. (2010) slatted concrete, solid concrete veya solid rubber zeminli barınaklarda barındırılan sığırların ayaklarındaki hastalıklar (dermatitis, white line disease, sole hemorrhage) üzerine yaptığı çalışmada dermatitis vakalarını slatted concrete zeminlerde daha sık görüldüğünü, ancak double sole olgularının solid concrete'de daha fazla tespit edildiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda kauçuk ve beton zeminli barınaklardaki sığırların ayaklarında solea hemorajilerine ve beyaz çizgi hastalığına rastlandığını bildirmişlerdir (Cook ve Nordlund, 2009; Kremer ve ark., 2007; Ouweltjes ve ark., 2009). Barınak zeminin ayak hastalıkları üzerine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda beton zeminli barınaklardaki sığırların tırnak lezyonu oranlarının, kauçuk ve kum zeminli barınaklardakine kıyasla daha fazla olduğu bildirmektedirler (Boyle ve ark., 2007; Vanegas ve ark., 2006). Yapılan bir çalışmada beton zeminlerin ve kötü barınak şartlarının ayak hastalıklarına (solea ülseri, çift tabanlılık, beyaz çizgi lezyonları, dermatitis) neden olduğunu bildirmektedir (Manske, 2002). Yaptığımız saha çalışmasında barınak zeminlerine göre ayak hastalıkları incelendiğinde beton zeminli barınaklarda; ökçe erezyonu %2.11, ökçe apsesi %0.94, interdigital hiperplazi %0.70, interdigital flegmon %0.47, pododermatitis aseptica diffuza %1.88, digital dermatitis %0.70, beyaz çizgi hastalığı %1.17, ökçe ve taban eziğine %1.64 oranında rastlandığı tespit edilmiştir. Taş zeminli barınaklarda; ökçe erezyonu %0.91, ökçe apsesi %2.73, interdigital hiperplazi %1.82, interdigital flegmon %1.82, pododermatitis aseptica diffuza %0.08, digital dermatitis %0.08, beyaz çizgi hastalığı %3.64, ökçe ve taban eziği %4.55 olarak saptanmıştır. Tahta zeminli barınaklarda; ökçe erezyonu %2.78, ökçe apsesi %1.39, interdigital hiperplazi %1.39, interdigital flegmon %2.78, pododermatitis aseptica diffuza %2.78, digital dermatitis %2.78, beyaz çizgi hastalığı %1.39, ökçe ve taban eziği %2.78 oranında gözlemlenmiştir. Kauçuk

zeminli barınaklarda; pododermatitis aseptica diffuza %1.16, ve digital dermatitis %1.16 olarak bulunmuş diğer hastalıklara rastlanmamıştır. Toprak zeminli barınaklarda ise bu oranlar; ökçe erezyonu %3.68, ökçe apsesi %2.51, interdigital hiperplazi %1.00, interdigital flegmon %1.84, pododermatitis aseptica diffuza %1.67, digital dermatitis %0.84, beyaz çizgi hastalığı %2.51, ökçe ve taban eziğine %4.18 olarak tespit edildi.

Ayak hastalıklarının saptandığı barınakların zeminlerinde yeterince hijyen kurallarına dikkat edilmemesi, idrar ve dışkı kanallarının yeterince olmaması, barınak zemininde altlık kullanılmaması, ayak banyosu ve tırnak bakımı gibi uygulamaların rutin olarak yapılmamasının etken olabileceği düşünüldü. Muş yöresinde yürütülen bu çalışmada, sığırlarda farklı zemin yapılarının tırnak deformasyonları ve ayak hastalıkları üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda ahır zeminlerinin yapısal özellikleri sığırlarda ayak-tırnak lezyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Albright JC, 1995: Flooring in dairy cattle facilities, in Proc. Int. Conf. Anim. Behav. Design. Livest. Poult. Syst., Indianapolis, IN, 168-182.
- Andersson L, Lundström K, 1981: Their influence of breed, age, body weight and season on digital diseases and hoof size in dairy cows. *J Vet Med A*, 28, 141-151.
- Barker ZE, Amory JR, Wright JL, Mason SA, Blowey RW, Green LE, 2009: Risk factors for increased rates of sole ulcers, white line disease and digital dermatitis in dairy cattle from twenty-seven farms in England and Wales. *J Dairy Sci*, 92, 1971-1978.
- Bell NJ, Huxley JN, 2009: The use of rubber floor matting on dairy units: a critical review. *Cat Pract*, 17, 142-147.
- Bergsten C, Frank B, 1996: Sole haemorrhages in tied primiparous cows as an indicator of periparturient laminitis: effects of diet, flooring and season. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 37, 383-394.
- Benz B, 2002: Elastische Beläge für spaltenböden in Liegeboxenlaufställen, PhD Thesis, Universität Hohenheim, Hohenheim, Germany
- Boyle L, Mee J, Kiernan P, 2007: The effect of rubber versus concrete passage ways in cubicle housing on claw health and reproduction of pluriparous dairy cows. *Appl Anim Behav Sci*, 106, 1-12.
- Chesterton RN, 1989: Examination and control of lameness in dairy herds. *N Z Vet J*, 37, 133-134.
- Clarkson MJ, Downham DY, Faull WB, Hughes JW, Manson FJ, Merritt JD, Murray RD, Russell WB, Sutherst JE, Ward WR, 1993: An epidemiological study to determine the risk factors of lameness in dairy cows, CSA 1379, Univ. Liverpool, United Kingdom.

- Cook NB, 2003: Prevalence of lameness among dairy cattle in Wisconsin as a function of housing type and stall surface. *JAVMA*, 223, 1324-1328.
- Cook NB, Nordlund KV, Oetzel GR, 2004: Environmental influences of claw horn lesions associated with laminitis and subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci*, 87(E.Suppl.), E36-E46.
- Cook NB, Nordlund KV, 2009: The influence of the environment on dairy cow behavior, claw health and herd lameness Dynamics. *Vet J*, 179, 360-369.
- Faye B, Lescourret F, 1989: Environmental factors associated with lameness in dairy cattle. *Preventative Veterinary Medicine*, 7, 267-287.
- Fjeldaas T, Sogstad ÅM, Østerås O, 2010: Locomotion and claw disorders in Norwegian dairy cows housed in free stalls with slatted concrete, solid concrete, or solid rubber flooring in the alleys. *J Dairy Sci*, 94, 1243-1255.
- Franck A, Verheghe B, Belie N, 2008: The effect of concrete floor roughness on bovine claws using finite element analysis. *J Dairy Sci*, 91, 182-192.
- Frankena K, Van Keulen KAS, Noordhuizen JP, Noordhuizen-Stassen EN, Gundelach J, De Jong DJ, Saedt I, 1992: A cross sectional study into prevalence and risk factors of digital haemorrhages in female dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 1-12.
- Helge CHL, Gygaxa B, Wechsler M, Stauffacher K, 2012: Influence of floor surface and access to pasture on claw health in dairy cows kept in cubicle housing systems. *Preventive Veterinary Medicine*, 105, 85-92.
- Hedges VJ, Blowey RJ, Packington AJ, O'Callaghan CJ, Green LE, 2001: A longitudinal field trial of the effect of biotin on lameness in dairy cows. *J Dairy Sci*, 84, 1969-1975.
- Hinterhofer C, Ferguson JC, Apprich V, Haider H, Stanek C, 2006: Slatted floors and solid floors: Stress and strain on the bovine hoof capsule analyzed in finite element analysis. *J Dairy Sci*, 89, 155-162.
- Kenneth V, Nigel B, Garrett R, 2004: Investigation Strategies for Laminitis Problem Herds. *J Dairy Sci*, 87(E. Suppl.), E27-E35.
- Krebs N, Berry SL, Tucker CB, 2011: Restless behavior increases over time, but not with compressibility of the flooring surface, during forced standing at the feed bunk. *J Dairy Sci*, 94, 97-105.
- Kremer PV, Nueske S, Scholz AM, Foerster M, 2007: Comparison of claw health and milk yield in dairy cows on elastic concrete flooring. *J Dairy Sci*, 90, 4603-4611.
- Manske T, 2002: Hoof lesions and lameness in Swedish dairy cattle; prevalence, risk factors, effects of claw trimming and consequences for productivity, Animal Environment and Health. Skara: Swedish Univ Agr (SLU).
- Nordlund KV, Cook NB, Oetzel GR, 2004: Investigation strategies for laminitis problem herds. *J Dairy Sci* 87, 27-35.
- Ouweltjes W, Holzhauer M, Van der Tol PP, Van der Werf J, 2009: Effects of two trimming methods of dairy cattle on concrete and rubber-covered slatted floors. *J Dairy Sci*, 92, 960-971.
- Somers JG, Frankena K, Noordhuizen-Stassen EN, Metz JH, 2003: Prevalence of claw disorders in Dutch dairy cow sex posed to several floor systems. *J Dairy Sci*, 86, 2082-2093.
- Telezhenko E, Bergsten C, 2005: Influence of floor type on the locomotion of dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science*, 93, 183-197.
- Tranter WT, Morris RS, 1992: Hoof growth and wear in pasture-fed dairy cattle. *N Z Vet J*, 40, 89-96.
- Van Amstel SR, Shearer JK, Palin FL, 2004: Moisture content, thickness, and lesions of sole horn associated with thin soles in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 87, 757-763.
- Vanegas J, Overton M, Berry SL, Sisco WM, 2006: Effect of rubber flooring on claw health in lactating dairy cows housed in free-stall barns. *J Dairy Sci*, 89, 4251-4258.
- Vermunt JJ, Greenough PR, 1996: Claw conformation of dairy heifers in two management systems. *Br Vet J*, 152, 321-331.
- Vermunt JJ, Greenough PR, 1995: Structural characteristics of the bovine claw: Horn growth and wear, horn hardness and claw conformation. *Br Vet J*, 151, 157-180.
- Vokey FJ, Guard CL, Erband HE, Galton DM, 2001: Effect of alley stall surface on indices of claw and leg health in dairy cattle housed in free stall barn. *J Dairy Sci*, 84, 2686-2699.
- Weaver AD, 2000: Lameness in the Health of Dairy Cattle. A.H. Andrews, ed. Blackwell Science, Oxford, United Kingdom, 149-202.

**\*Yazışma Adresi:** Eren POLAT

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Cerrahi Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.  
e-mail: erenpolat@firat.edu.tr

## Kısırlaştırılan Kedilerde Krom Pikolinatın Ağırlık Artışı, Morfometrik Ölçümler ile Kan Lipid ve Leptin Seviyelerine Etkisi\*\*

Öznur ASLAN<sup>1</sup>, Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ<sup>2\*</sup>, Fatma UYANIK<sup>3</sup>, Yücel ÇAM<sup>1</sup>, Kazım GÜVENÇ<sup>4</sup>, Kutlay GÜRBULAK<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

<sup>3</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

<sup>4</sup>İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye.

<sup>5</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Geliş Tarihi: 07.11.2016

Kabul Tarihi: 26.12.2016

**Özet:** Çalışmanın amacı, kısırlaştırılmış kedilerde krom pikolinatın (CrPic) morfometrik parametreler, ağırlık artışı ile serum lipit ve leptin seviyeleri üzerine etkisinin belirlenmesidir. Kısırlaştırılıp, 2 ay adaptasyon süresini takiben çalışmaya dahil edilen 32 (22 dişi ve 10 erkek) adet, yaşları 1-5 arasında değişen ve ağırlık ortalaması 3021 ± 453 g olan kediler 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubu olarak tutulan kediler (Kontrol I), günlük enerji gereksinimi (60 kcal ME/kg) hesaplanarak ticari kuru mama ile beslendi. Ad-libitum beslenen diğer gruptaki kedilere sırasıyla CrPic kapsülden 0 (Kontrol II), 200 ya da 600 µg Cr/gün, 16 hafta süreyle uygulandı. En fazla ağırlık artışının belirlendiği Kontrol II'de, deri kalınlığı, abdominal çevre ve leptin düzeyinde düşük oranda bir artış gözlenirken, vücut kitle indeksi (BMI) ve göğüs çevresindeki artış önemli bulundu (P<0.05). CrPic verilen gruplarda ise bu değişkenlerdeki azalma önemli değildi. Plazma leptin seviyesi ile vücut ağırlığı (r = 0.510, P<0.01) ve aterosjenik indeks (AI) arasında pozitif korelasyon (r = 0.479, P<0.05) belirlenirken, Cr arasında negatif korelasyon (r = -0.445, P<0.05) belirlendi. Kontrol II'de trigliserit (TG), total kolesterol (TC), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), LDL ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) oranı ve AI değerleri en yüksek seviyede olmakla birlikte, gruplar arasında fark gözlenmedi. Krom ilavesinin de bu parametrelere önemli bir etkisinin olmadığı saptandı. Serum Cr ve total kolesterol düzeyleri arasında negatif ilişki belirlendi (r = -0.468, P<0.05). Sonuç olarak, kısırlaştırıldıktan sonra ad-libitum beslenen tüm gruplarda canlı ağırlık, BMI, deri altı yağ doku ve plazma leptin seviyesinde artış belirlenirken, krom ilavesinin bu parametrelere önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Kedi, Krom, Morfometrik ölçüm, Leptin, Lipit.

### Effects of Chromium Picolinate on Weight Gain, Morphometric Measurements and, Blood Lipid and Leptin Levels in Gonadectomized Cats

**Abstract:** The aim of this study was determined to the effects of chromium picolinate (CrPic) on morphometric measurements, weight gain, and serum lipid and leptin levels in gonadectomized cats. Thirty two (22 female, 10 male), aged 1-5 years, weighing 3021 ± 453 g, were evenly distributed into four groups following a two month adaptation period after gonadectomy. Cats in one group was kept as control (Control I) and fed commercial dry cat food at the amount providing the daily requirements of 60 kcal ME/kg body weight. Cats in the remaining groups fed ad-libitum and supplemented daily with either 0 (Control II), 200 or 600 µg Cr/day as CrPic capsules for 16 weeks. The most marked increase in weight gain was determined in Control II in which significant increase was observed in chest circumference and body mass index (BMI) (P<0.05) whereas slightly increased levels were reported in Skinfold thickness, abdominal circumference and leptin levels. On the other hand, in the CrPic groups (200 and 600 µg/day) the reported decrease in these variables were not significant. Positive correlations were found between weight gain and plasma leptin (r = 0.510, P<0.01) and leptin and atherogenic index (AI) (r = 0.479, P<0.05) while Cr negatively correlated with leptin (r = -0.445, P<0.05). Although differences between groups were not significant, the highest values were determined in Control II regarding triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL), LDL to high density lipoprotein (HDL) ratio and AI. It was determined that chromium supplementation did not have significant effect on these parameters. Negative relationship was determined between serum Cr and TC (r = -0.468, P<0.05). In conclusion, in all groups ad-libitum feeding after gonadectomy resulted to increased weight gain, BMI, subcutaneous fat deposition and plasma leptin level. There is no effect in these parameters of chromium supplementation.

**Keywords:** Cat, Chromium, Morphometric measurements, Leptin, Lipid.

### Giriş

Sağlık ve vücut fonksiyonlarında bozulmayan sonuçlanabilen ve vücut yağ oranının artışı olarak tanımlanan obezite (Laflamme, 1997; Muğlalı 1998),

küçük hayvan hekimliğinde karşılaşılan beslenme bozukluklarının en yaygın olanıdır (Ishioaka ve ark., 2002). Kedi ve köpeklerin, hastalıklara neden



olabilecek düzeyde aşırı kilolu kabul edilmelerinin ölçütleri tam olarak belirlenememiş olmasına karşın, ırk, cinsiyet ve yaşa göre ideal ağırlığının %15'inin üzerine çıkan kediler obez olarak kabul edilir (Laflamme, 1997; Muğlalı 1998).

Kedilerde aşırı besleme, hareketsizlik ve yaşlılık gibi pekçok faktör obezitenin gelişmesini ve kilo alma eğilimini arttırır (Donoghue ve Scarlett 1998; Rand ve Martin 2004). Gonadektomi sonrası da kedilerde, harcanan enerjinin azalması ve gıda tüketiminin artması nedeniyle ağırlık artışı görülür (Fettman ve ark., 1997; Harper ve ark., 2001; Kanchuk ve ark., 2002; Nguyen ve ark., 2004). Ağırlık artışı ve vücut yapısındaki değişimler biyokimyasal ve fizyolojik parametere değişikliğine neden olur. Obezitede, adipositlerde trigliserit düzeyi artmaktadır. Adipositlerde depolanan trigliserit düzeyinin kontrolünde ise çeşitli hormonlar ve enzimler rol oynamaktadır. Gonadektomi, gonadal hormonların sirkülasyondaki düzeyini azalttığından ya doğrudan ya da vücuttaki yağ depolarının regülasyonunda uzun dönemde etki gösteren hormonlar arasında bulunan insülin ve leptin'i etkileyerek vücut yağ kitlesinin regülasyonunu bozmaktadır (Kanchuk ve ark., 2002).

Bir obez (ob) gen ürünü olan leptin başlıca yağ doku olmak üzere ince bağırsak ve pankreasta sentezlenen ve salgılanan 16 kDa'luk bir proteindir (Nelson ve Cox, 2000). Çeşitli çalışmalarda, ağırlık artışının plazma leptin konsantrasyonunu arttırdığı belirtilmiştir (Maffei ve ark., 1995; Friedman ve Halaas, 1998). Kedilerde gonadektomiden sonra gelişen (Martin ve ark., 2001; Kanchuk ve ark., 2002), ağırlık artışıyla plazma leptin konsantrasyonunun yükseldiği (Martin ve ark., 2001; Kanchuk ve ark., 2003; Rand ve Martin, 2004) bildirilmiştir. Sağlıklı kedilerde yapılan bir başka çalışmada da (Shibata ve ark., 2003) plazma leptin düzeylerinin 0.3 ile 29.7 ng/ml arasında (ortalama  $4.5 \pm 1.3$ ) değiştiği ve vücut yağ oranı ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir. İnsan ve rodentlerde, kan leptin konsantrasyonunun vücut yağ oranı (Maffei ve ark., 1995) köpeklerde canlı ağırlık, vücut kitle indeksi ve vücut yağ oranı arasında bir korelasyon olduğu saptanmıştır (Shibata ve ark., 2005). Kan leptin konsantrasyonunun belirlenmesiyle yağ doku oranının doğru ve güvenilir bir şekilde ölçülebildiği bildirilmiştir (Ishioka ve ark., 2002; Shibata ve ark., 2003).

Trivalent krom ( $Cr^{3+}$ ) insan ve hayvanlarda beslenme açısından esansiyel iz mineral olarak kabul edilir (Mertz, 1993; WHO, 1996; Anderson, 1998). Krom, insülinin etkisini artırarak karbonhidrat metabolizmasında yer aldığı gibi protein ve lipid metabolizmalarının düzenlenmesinde de rol oynar (WHO, 1996). Çeşitli hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar (WHO, 1996; Anderson,

1998) kromun büyüme, üreme ve immun sistem üzerinde yararlı etkilerini göstermiştir.  $Cr^{3+}$ 'un vücut yapısında faydalı etkisi olmadığını belirten çalışmaların aksine (Amato ve ark., 2000; Lukaski ve ark., 2007), hayvanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalar, kromun yağ dokuyu azalttığı ve kas dokuyu arttırdığı bildirilmiştir (Boleman ve ark., 1995; Hasten ve ark., 1997; Uyanık, 2001; Sun ve ark., 2003). Bu nedenle kromun biyolojik fonksiyonlar üzerindeki etkisini araştıran çalışmaların yapılmasına hala ihtiyaç vardır. Bu çalışmada, gonadektomize edilen ve ad-libitum beslenen kedilerde ağırlık kazancının kontrolü, deri kalınlığı, göğüs çevresi gibi morfolometrik parametreler ile serum lipid ve leptin düzeylerine krom pikonatin etkisinin belirlenmesi amaçlandı.

## Materyal ve Metot

Bu çalışmaya, yaşları 1-5 arasında değişen, ortalama  $3021 \pm 453$  g canlı ağırlıkta, melez, 22 dişli ve 10 erkek olmak üzere toplam 32 kedi dahil edildi. Çalışma sırasında Kontrol I'deki kedilerden biri çalışma dışı kaldığından çalışmaya 31 kedi ile devam edildi.

Kedilerin klinik muayeneleri yapılarak iç parazitlere karşı piperazin (Siropar srp. Adeka®) ile 0.5 g niclozamid (Yomesan tablet. Bayer®) verildikten sonra çalışmaya dahil edilen kediler, kuduz (Rabisin, VetPet®) ve diğer bulaşıcı hastalıklara (Feline Rhinotrachitis, Panleucopenia, Calici virüs) (Rhinopan, Biocar®) karşı aşılandı. Kediler denemeye alınmadan önce kısırlaştırıldı (Fossum, 1997).

Kediler tamamen iyileştikten sonra Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesinde bulunan barınakta 90x60x60 cm boyutlarındaki kafeslere yerleştirilerek, ortama ve mamaya alışmalarını sağlamak amacıyla herhangi bir uygulama yapılmadan iki ay beslendi. Çalışma süresince hayvanların barındırıldığı üniteye aydınlatma normal gün ışığı ile sağlandı, ortam sıcaklığının ortalama 20-22 °C'de tutulabilmesi için gerektiğinde termostat kontrollü elektrikli ısıtıcılardan yararlanıldı. Hayvanların suluklarında sürekli temiz su bulunduruldu. Adaptasyon süresini takiben, araştırmaya başlanmadan önce, kedilerin tekrar klinik muayeneleri yapılarak genel durumu, beden ısısı, solunum sayısı, nabız sayısı kontrol edildi. Deneme başında kedilerin ağırlıkları belirlenip grupların ağırlık ortalamalarının eşit olması sağlanarak, her grupta 8'er hayvan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplardaki kediler, 4500 kcal/kg metabolize edilebilir enerji (ME) içeren ticari kuru kedi maması (Tablo 1) ile beslendi.

Birinci gruptaki kediler tüm araştırma süresince sağlıklı kontrol (Kontrol I) olarak tutuldu ve bu

gruptaki kedilere günlük besin madde ihtiyacını (60-88 kcal/kg vücut ağırlığı) (Muğlalı, 1998) karşılayacak düzeyde (60 kcal/kg vücut ağırlığı ME) mama tartılarak bireysel yemliklere verildi. İkinci gruptaki kediler de Kontrol (Kontrol II) olarak tutuldu ve araştırma süresince bu gruptaki kedilere mama ad-libitum verildi. Bu gruptaki kediler, ağırlık artışı kontrolü olarak tutulduklarından, deneme başı ağırlığına göre %20 ağırlık artışı ölçütü olarak alındı.

Kedilerdeki ağırlık artışı %20'yi geçtiğinde bu gruptaki hayvanlar fazla kilolu olarak kabul edildi. Üçüncü gruptaki kediler ad-libitum beslendi ve bu gruptaki kedilere CrPic formunda günde 200 µg Cr (200 µg Cr içeren 1 tablet, Solgar Inst., USA) 16 hafta oral yolla verildi. Dördüncü gruptaki kediler ad-libitum beslendi; bu gruptaki kedilere CrPic formunda günde 600 µg Cr (200 µg Cr içeren 3 tablet, Solgar Inst., USA) 16 hafta oral yolla verildi.

**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan mamanın kimyasal bileşimi

Kimyasal analiz değerleri	%	Etiket bilgileri	%
Kuru madde	96.20	Kuru madde, en fazla	90.00
Ham protein	32.80	Ham protein, en az	33.00
Ham yağ	23.10	Ham yağ, en az	22.00
Ham kül	6.70	Ham kül, en fazla	8.00
Ham selüloz	3.45	Ham selüloz, en fazla	3.00
		ME (kcal/kg)	4500

**Tablo 2.** Kedilerde krom pikolinatın ağırlık, deri kıvrım kalınlığı, göğüs ve bel çevresi, BMI ve plazma leptin düzeyine etkisi

Parametre	Krom (µg/gün)				P
	Kontrol (I) n: 7	Kontrol (II) n: 8	200 n: 8	600 n: 8	
<b>Ağırlık (g)</b>					
Deneme başı	2847 ± 119	3226 ± 150	3137 ± 206	2855 ± 134	-
Deneme sonu	3234 ± 127	4199 ± 308	3853 ± 270	3620 ± 204	0.067
Ağırlık artışı (g)	387 ± 171	973 ± 193	715 ± 162	765 ± 152	-
Ağırlık artışı (%)	14.65 ± 6.48	29.52 ± 5.06	23.21 ± 5.20	27.10 ± 5.20	-
<b>Deri kıvrım kalınlığı (mm)</b>					
Deneme başı	2.29 ± 0.37	2.72 ± 0.43	2.38 ± 0.17	2.18 ± 0.28	-
Deneme sonu	2.74 ± 0.29	3.69 ± 0.38	2.86 ± 0.38	2.88 ± 0.40	-
<b>Göğüs çevresi (cm)</b>					
Deneme başı	26.43 ± 1.32	30.56 ± 1.24	29.50 ± 0.90	29.13 ± 1.13	-
Deneme sonu	28.86 ± 0.51 <sup>b</sup>	33.63 ± 1.36 <sup>a</sup>	31.25 ± 1.10 <sup>ab</sup>	30.71 ± 0.47 <sup>ab</sup>	0.019
<b>Karın çevresi (cm)</b>					
Deneme başı	27.57 ± 1.82	32.44 ± 1.46	29.56 ± 1.49	28.25 ± 1.32	-
Deneme sonu	30.28 ± 0.99	35.75 ± 1.94	33.88 ± 2.08	33.71 ± 1.54	-
<b>Leptin (ng/ml)</b>					
Deneme başı	3.05 ± 0.39	2.42 ± 0.48	2.34 ± 0.27	3.40 ± 0.74	-
Deneme sonu	4.05 ± 0.69	6.15 ± 0.72	5.49 ± 1.08	4.24 ± 0.84	-
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>					
Deneme sonu	23.40 ± 0.95 <sup>b</sup>	28.80 ± 1.19 <sup>a</sup>	27.11 ± 1.10 <sup>a</sup>	26.30 ± 1.51 <sup>ab</sup>	0.030

-: önemsiz ; BMI: Vücut kitle indeksi, kg/m<sup>2</sup>

<sup>a-b</sup>: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir.

**Morfometrik Ölçümler:** Deneme süresince hayvanların iki haftada bir canlı ağırlıkları ölçüldü ve ad-libitum beslenen ancak Cr verilmeyen kontrol grubunda canlı ağırlık artışı, deneme başlangıcı ağırlığına göre, %20'nin üzerine çıktığında hedeflenen canlı ağırlık artışının sağlandığı kabul edildi. Çalışmanın başında ve sonunda torakal-lumbal (göğüs-karın çevresi) genişlikleri ve her iki skapulunun hemen altından deri kalınlıkları kumpasla ölçüldü. Deneme sonunda Appleton ve ark. (2001) tarafından kediler için bildirilen formül [BMI= Canlı ağırlık (kg)/[Vücut uzunluğu (m) x yükseklik (m)] ile vücut kitle indeksi (BMI)

hesaplandı. Vücut uzunluğu ve yüksekliği Elliott ve ark. (2002)'nin bildirdikleri şekilde ölçüldü.

**Serum ve Plazmaların Muhafazası:** Deneme başı ve sonunda kedilerin *V. jugularis*'lerinden serum biyokimyasal parametreleri için 5 ml antikoagülsüz ve leptin analizleri için 5 ml K<sub>3</sub>EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri hemen buz içerisine konuldu ve laboratuvarında plazmaları ayrıldı. Kazanılan plazmalar analizler gerçekleştirilinceye kadar -80°C'de muhafaza edildi.

**Serum Analizleri ve İndeks Hesaplamaları:** Serum örneklerinin trigliserit (TG), total kolesterol (TC) ve

yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyleri spektrofotometrik yöntemle çalışan ticari kitler (IBL®, Japonya) kullanılarak, Shimatzu UV 1208 model spektrofotometre ile belirlendi. Plazma leptin düzeyi multispecies leptin kiti (Linco Research) ile saptandı. Serum LDL düzeyi Friedewald formülü [ $LDL=TC-(HDL+TG/5)$ ] kullanılarak hesaplandı. Ayrıca, HDL/TC, LDL/HDL (Randal ve Gibson, 1988) ve atherogenik indeks [ $AI=(TC-HDL)/(HDL)$ ] (Bolken ve ark., 2006) hesaplama yoluyla belirlendi.

**Krom Analizleri:** Serum Cr düzeylerinin belirlenmesinde, matriks modifier olarak Triton X-100 kullanıldı. Serumlar 1:1 oranında %0.1 triton X-100 ile karıştırıldı. Kedi maması Cr düzeyleri ise küllendirilip nitrik asit dijesyonu yapılarak grafit fırınlı (GTA-110) Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (Varian AA 880) ile belirlendi.

**Kedi Mamasının Besin Madde Analizleri:** Kedi mamasının besin madde içeriği (ham protein, ham selüloz, ham yağ, kül, kuru madde) AOAC (1984) tarafından bildirilen metoda göre belirlendi.

**Verilerin Değerlendirilmesi:** Elde edilen verilerin istatistiki analizi Microsoft için SPSS 10.0 paket programı ile yapıldı. Gruplar arasındaki farkın önem kontrolü tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile belirlendi. Gruplar arasındaki fark önemli bulunduğunda Duncan's Multiple range test yapılarak farkın hangi gruptan kaynaklandığı belirlendi. Deneme öncesi ve deneme sonrası verilerin karşılaştırılmasında tekrarlı ölçümler için General Linear Model (GLM) kullanıldı. Kan leptin, Cr düzeyi ve BMI, deri kıvrım kalınlığı, göğüs ve bel çevresi ve ayrıca ölçülen biyokimyasal parametreler arasında korelasyon olup olmadığı Pearson regresyon analizi ile belirlendi. Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi.

## Bulgular

**Kedilerde Krom Pikolinatın Morfometrik Ölçümler ve Plazma Leptin Düzeyine Etkisi:** Deneme sonunda, Kontrol II'de göğüs çevresi ve BMI önemli

( $P<0.05$ ) oranda yüksek bulundu. Ayrıca, Kontrol I ile kıyaslandığında, ağırlık artışı ( $P=0.067$ ), deri kıvrım kalınlığı ( $P>0.05$ ), karın çevresi ( $P>0.05$ ) ve leptin düzeyi ( $P>0.05$ ) yönünden de en yüksek değerler Kontrol II'de belirlendi. Krom verilen gruplarda ise değerlendirilen parametreler Kontrol II'ye göre azaldı fakat fark önemli bulunmadı (Tablo 2). Canlı ağırlık artışı ile deri kalınlığı ( $r = 0.680$ ,  $P<0.001$ ), göğüs çevresi ( $r = 0.666$ ,  $P<0.001$ ) karın çevresi ( $r = 0.754$ ,  $P<0.001$ ), BMI ( $r = 0.760$ ,  $P<0.001$ ) ve plazma leptin düzeyi ( $r = 0.510$ ,  $P<0.01$ ) arasında pozitif korelasyonlar belirlendi. Ayrıca, deri kalınlığı ile göğüs çevresi ( $r = 0.501$ ,  $P<0.01$ ), karın çevresi ( $r = 0.495$ ,  $P<0.05$ ) ve trigliserit ( $r = 0.391$ ,  $P<0.05$ ) arasında pozitif korelasyon saptandı. Göğüs çevresi ile AI ( $r = 0.424$ ,  $P<0.05$ ) ve karın çevresi ile trigliserit ( $r = 0.382$ ,  $P<0.05$ ) pozitif ilişkili bulundu. Plazma leptin düzeyi ile Cr düzeyi ( $r = -0.445$ ,  $P<0.05$ ) ve HDL/TC ( $r = -0.414$ ,  $P<0.05$ ) arasında negatif bir ilişki saptanırken leptin düzeyi ile trigliserit ( $r = 0.521$ ,  $P<0.01$ ), total kolesterol ( $r = 0.392$ ,  $P<0.05$ ) ve AI ( $r = 0.479$ ,  $P<0.05$ ) arasında pozitif korelasyonlar belirlendi.

**Kedilerde Krom Pikolinatın Serum Lipit Düzeylerine Etkisi:** Serum lipit parametreleri yönünden gruplar arasında önemli bir fark saptanmadı. Ancak, Kontrol I ile kıyaslandığında Kontrol II grubunda trigliserit, total kolesterol, LDL düzeylerinin, LDL/HDL oranı ve AI değerlerinin rakamsal olarak daha yüksek ve HDL/TC oranının ise daha düşük olduğu belirlendi. Krom verilen gruplarda trigliserit, total kolesterol ve LDL düzeyleri, AI ve LDL/HDL oranının Kontrol I ve Kontrol II gruplarındaki değerlerden düşük olduğu belirlendi (Tablo 3). Total kolesterol düzeyi ile AI arasında yüksek bir ilişki bulundu ( $r = 0.906$ ,  $P<0.001$ ). Leptin ile trigliserit düzeyi ( $r = 0.521$ ,  $P<0.01$ ) ve AI ( $r = 0.479$ ,  $P<0.05$ ) arasında pozitif, leptin ile HDL/TC arasında ise negatif ( $r = -0.417$ ,  $P<0.05$ ) korelasyonlar saptandı. Krom ile trigliserit ve AI arasında istatistiki öneme ulaşmayan, fakat Cr ile total kolesterol arasında ise önemli ( $r = -0.468$ ,  $P<0.05$ ) negatif ilişkiler olduğu saptanmıştır.

**Tablo 3.** Krom pikolinatın kedilerde serum lipit düzeylerine etkisi

Parametre	Krom ( $\mu\text{g/gün}$ )				P
	Kontrol (I) n: 7	Kontrol (II) n: 8	200 n: 8	600 n: 8	
TG (mg/dl)	37.68 $\pm$ 7.22	50.06 $\pm$ 18.58	27.31 $\pm$ 1.74	33.25 $\pm$ 7.56	-
TC (mg/dl)	129.69 $\pm$ 8.99	136.53 $\pm$ 8.48	112.53 $\pm$ 7.87	122.69 $\pm$ 11.94	-
HDL (mg/dl)	80.49 $\pm$ 1.96	77.16 $\pm$ 2.07	72.54 $\pm$ 2.66	81.49 $\pm$ 3.25	-
LDL (mg/dl)	40.71 $\pm$ 10.38	49.36 $\pm$ 6.88	32.64 $\pm$ 7.54	35.49 $\pm$ 9.74	-
LDL/HDL	0.50 $\pm$ 0.12	0.64 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.09	0.42 $\pm$ 0.10	-
HDL/TC	0.64 $\pm$ 0.04	0.58 $\pm$ 0.03	0.67 $\pm$ 0.04	0.69 $\pm$ 0.06	-
AI	0.60 $\pm$ 0.11	0.77 $\pm$ 0.09	0.52 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.11	-

-: önemsiz

## Tartışma ve Sonuç

Kedi ve köpeklerin, hastalıklara neden olabilecek düzeyde aşırı kilolu kabul edilmelerinin ölçütleri tam olarak belirlenememiş olmasına karşın, optimum ağırlığın %15'inin üzerine çıkması durumunda kedi ve köpeklerin obez olarak kabul edildiği bildirilmiştir (Muğlalı, 1998). Deneme sonunda, ad-libitum beslenen kontrol grubunda (Kontrol II), ağırlık artışı deneme başına göre % 20'yi geçtiğinde, bu gruptaki kediler fazla kilolu olarak değerlendirildi (Laflamme, 1997). Ad-libitum beslenen CrPic gruplarında ağırlık artışı Kontrol II'den düşük olsa da, farklılığın önemli olmaması, insanlarda (Lukaski ve ark., 2007), domuzlarda (Page ve ark., 1993) ve koyunlarda (Uyanık, 2001) Cr'un canlı ağırlık artışı etkilemediğini bildiren araştırmacıların bulgularını desteklemektedir.

Kilo almaya bağlı olarak özellikle abdominal bölgede ve deri altında yağ doku artışı şekillendiğinden (Laflamme, 1997), bu çalışmada, istatistiki önemde olmamasına karşın en yüksek deri kıvrım kalınlığı ile karın çevresi değerleri Kontrol II de belirlendi. Bir obez (ob) gen ürünü olan ve başlıca sentez yeri yağ doku olan (Nelson ve Cox, 2000) ve yağ doku oranının doğru ve güvenilir bir göstergesi olduğu bildirilen (Shibata ve ark., 2003) leptin düzeyinde de en yüksek değer Kontrol II grubunda saptandı. Ad-libitum beslenen kontrol grubunda (Kontrol II), Kontrol I'e göre göğüs çevresi ve BMI değerinin önemli düzeyde, deri kıvrım kalınlıklarının ve leptin düzeylerinin de rakamsal olarak yüksek olması vücut yağ oranının artmasına bağlanabilir. Bu çalışmada, en yüksek leptin düzeyinin en fazla ağırlık artışı görülen Kontrol II grubunda saptanması ve ağırlık artışı, BMI ile deri kıvrım kalınlığı arasında pozitif korelasyon bulunması; kan leptin konsantrasyonu ile vücut yağ oranı arasında bir korelasyon olduğu (Martin ve ark., 2001), leptin konsantrasyonunun obezitede arttığı (Maffei ve ark., 1995) ve ağırlık artışının plazma leptin düzeyini arttırdığını bildiren (Friedman ve Halaas, 1998; Kanchuk ve ark., 2003) çalışmaları desteklemektedir. Benzer şekilde, Apletton ve ark. (2000) kedilerde ağırlık artışı ile plazma leptin düzeyinde üç kat artış olduğunu, ağırlık artışından önce ortalama  $7.88 \pm 4.02$  ng/ml olan leptin düzeyinin  $24.5 \pm 12.1$  ng/ml'ye yükseldiğini bildirmişlerdir.

Ratlarda yapılan çalışmalarda, Cr'un leptin düzeyini düşürdüğü (Sun ve ark., 2000) ve böbrek-testis çevresi yağ oranını azalttığı, yağsız vücut kitlesini artırdığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2003). Zha ve ark. (2007)'da, ratlarda 150, 300, 450 ve 600 ppb düzeylerinde nanopartikül formunda Cr'un yağ oranını azalttığını, 300 ve 450 ppb düzeylerinin ise yağsız vücut kitlesini arttırdığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada da, Cr verilen gruplarda göğüs çevresi

değeri ve BMI'deki gerilemenin yanında, istatistiki önemde olmasa da, leptin düzeyinde görülen azalma, insanlarda ve hayvanlarda Cr'un kas kitlesini arttırarak ve/veya etkilemeyerek yağ oranını azalttığını bildiren bazı çalışmaları (Boleman ve ark., 1995; Hasten ve ark., 1997; Amato ve ark., 2000; Uyanık, 2001; Sun ve ark., 2003; Lien ve ark., 2007; Zha ve ark. 2007) desteklemektedir. Sunulan çalışmada, plazma leptin düzeyi ile krom arasındaki negatif ilişkinin yanı sıra leptin ile trigliserit arasındaki pozitif ilişki de yağ oranının azaldığını doğrulamaktadır. Bu çalışmada vücut yağ oranında meydana gelen azalma, CrPic'in preadiposit proliferasyonu ve differensiyasyonunu baskılaması sonucu adiposit sayısının azalmasının yanında lipogenez ile ilişkili enzimlerin aktivitesinin baskılanması sonucunda trigliserit sentezinin aksamasına (Lien ve ark., 2007) bağlı olarak depo yağların azalmasından ileri gelebilir.

Yağ içeriği yüksek besi danası ve rat rasyonlarına eklenen Cr'un trigliserit düzeylerini düşürdüğü belirlenmiştir (Besong ve ark., 2001; Striffler ve ark., 1998). Koyunlarda ise krom ile serum trigliserit düzeyi düşmüş; total kolesterol ve LDL düzeyi etkilenmezken, HDL-kolesterol düzeyi yükselmiştir (Uyanık, 2001). Bu çalışmada, istatistiki önemde olmasa da Kontrol II'de trigliserit, LDL ve TC düzeylerinde meydana gelen yükselmenin yanı sıra HDL/TC oranındaki düşme ve AI oranındaki artışın BMI'deki artışla uyumlu olması kilo artışına bağlı olarak serum lipit parametrelerinde değişikliklerin oluşabileceğini bildiren çalışmaları desteklemektedir (Mennen, 1998; Sunvold, 1998). Matthews ve ark. (2001) domuzlarda, CrPic ve krom propionatın total kolesterol düzeylerini ve HDL/TC oranını etkilemediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da, total kolesterol ve LDL düzeyleri, AI, LDL/HDL ve HDL/TC oranları bakımından gruplar arasında önemli bir fark belirlenmezken, Cr ile total kolesterol arasında kuvvetli bir negatif ilişkinin olduğu tespit edildi.

Sonuç olarak, kedilerde gonadektomi sonrası, aşırı besleme ve hareketsizliğin ağırlık artışına yol açtığı, BMI ile deri altı yağ doku ve leptin düzeyini arttırdığı ancak; krom ilavelerinin incelenen parametrelere etkisinin zayıf olduğu belirlendi. Gelecekte değişik Cr bileşiklerinin farklı düzeylerinin uygulandığı, uzun süreli karşılaştırmalı çalışmaların yapılmasının yararlı olabileceği kanaatine varıldı.

## Kaynaklar

- AOAC 1984: Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 14<sup>th</sup> ed., Arlington Inc., Virginia, USA.
- Amato P, Morales AJ, Yen SSC, 2000: Effects of chromium picolinate supplementation on insulin sensitivity, serum lipids, and body composition in healthy, nonobese, older men and women. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 55, 260-263.
- Anderson RA, 1998: Recent advances in the clinical and biochemical manifestation of chromium deficiency in human and animal nutrition. *J Trace Elem Exper Med*, 11, 241-250.
- Appleton DJ, Rand JS, Sunvold GD, 2001: Insulin sensitivity decreases with obesity and lean cats with low insulin sensitivity are at greatest risk of glucose intolerance with weight gain. *J Feline Med Surg*, 3, 211-228.
- Besong S, Jackson JA, Trammell DS, Akay V, 2001: Influence of supplemental chromium on concentrations of liver triglyceride blood metabolites and rumen VFA profile in steers fed moderately high fat diet. *J Dairy Sci*, 84, 1679-1685.
- Boleman SL, Boleman SJ, Bidner TD, Southern LL, Ward TL, Pontif JE, Pike MM, 1995: Effect of chromium picolinate on growth body composition and tissue accretion in pigs. *J Anim Sci*, 73, 2033-2042.
- Bolkent S, Yanardag R, Bolkent S, Mutlu O, Yildirim S, Kangawa K, Minegishi Y, Suzuki H, 2006: The effect of zinc supplementation on ghrelin-immunoreactive cells and lipid parameters in gastrointestinal tissue of streptozotocin-induced female diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 286, 77-85.
- Donoghue S, Scarrlett JM, 1998: Diet and feline obesity. *J Nutr*, 128, 2776-2778.
- Elliott DA, Backus RC, Van Loan MD, Rogers QR, 2002: Evaluation of multifrequency bioelectrical impedance analysis for the assessment of extracellular and total body water in healthy cats. *J Nutr*, 132, 1757-1759.
- Fettman NJ, Stanton CA, Banks LL, Hamar DW, Johnson DE, Hegstad RL, Johnston S, 1997: Effect of neutering on bodyweight metabolic rate and glucose tolerance of domestic cats. *Res Vet Sci*, 62, 131-136.
- Fossum TW, 1997: Surgery of the Genital and Reproductive systems, in *Small Animal Surgery*, In Fossum TW (eds.) 1<sup>th</sup> Edn, Elsevier Mosby, Philadelphia. pp: 538-574.
- Friedman JM, Halaas JL, 1998: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-770.
- Harper EJ, Stack DM, Watson TD, Moxham G, 2001: Effect of feeding regimens on bodyweight composition and condition score in cats following ovariectomy. *J Small Anim Pract*, 42, 433-438.
- Hasten DL, Hegsted M, Keenan MJ, Morris GS, 1997: Dosage effects of chromium picolinate on growth and body composition in the rat. *Nutr Res*, 17, 1175-1186.
- Ishioka K, Soliman MM, Sagawa M, Nakadomo F, Shibata H, Honjoh T, Hashimoto A, Kitamura H, Kimura K, Saito M, 2002: Experimental and clinical studies on plasma leptin in obese dogs. *J Vet Med Sci*, 64, 349-353.
- Kanchuk ML, Backus RC, Calvert CC, Morris JG, Rogers QR, 2002: Neutering induces changes in food intake body weight plasma insulin and leptin concentrations in normal and lipoprotein. *J Nutr*, 132, 1730-1732.
- Kanchuk ML, Backus RC, Calvert CC, Morris JG, Rogers QR, 2003: Weight gain in gonadectomized normal and lipoprotein lipase-deficient male domestic cats results from increased food intake and not decreased energy expenditure. *J Nutr*, 133, 1866-1874.
- Laflamme D, 1997: Development and validation of a body condition score system for cats. *Clin Tool Feline Prac*, 25, 13-18.
- Lien TF, Wu CP, Horng YM, 2007: Chromium picolinate depressed proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Nutr Res*, 27, 176-180.
- Lukaski HC, Siders WA, Penland JG, 2007: Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight composition and iron status. *Nutrition*, 23, 187-195.
- Maffei M, Halas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM, 1995: Leptin levels in human and rodent- measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*, 1, 1155-1161.
- Martin L, Siliart B, Dumon H, Backus R, Biourge V, Nguyen P, 2001: Leptin body fat content and energy expenditure in intact and gonadectomized adult cats: a preliminary study. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 85, 195-199.
- Matthews JO, Southern LL, Fernandez JM, Pontif JE, Bidner TD, Odgaar RL, 2001: Effect of chromium picolinate and chromium propionate on glucose and insulin kinetics of growing barrows and on growth and carcass traits of growing-finishing barrows. *J Anim Sci*, 79(8), 2172-2178.
- Mennen B, 1998: Dietary chromium: an overview. *Chromium Information Bureau*.
- Mertz W, 1993: Chromium in human nutrition: a review. *J Nutr*, 123, 626-633.
- Muğlalı ÖH, 1998: Beslenme Hastalıkları ve Klinik Besleme. In: "Köpek ve Kedi Besleme Beslenme Hastalıkları ve Klinik Besleme", Ed; Ergün A ve Muğlalı ÖH, Genç Büro, Ankara, Türkiye.
- Nelson DL, Cox MM, 2000: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 3<sup>th</sup> ed., Worth Publishers, New York, USA.
- Nguyen PG, Dumon HJ, Siliart BS, 2004: Effects of dietary fat and energy on body weight and composition after gonadectomy in cats. *Am J Vet Res*, 65(12), 1708-1713.

- Page TG, Southern LL, Ward TL, Thompson DL, 1993: Effect of chromium picolinate on growth and serum and carcass traits of growing-finishing pigs. *J Anim Sci*, 71, 656-662.
- Rand JS, Martin G, 2004: Feline Obesity: causes consequences and management. In: 29<sup>th</sup> World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, Rhondes, Greece, pp. 382-384.
- Randall JA, Gibson RS, 1988: Serum insulin and serum lipid profiles of a selected group of southern ontario tannery workers with elevated serum and urine chromium concentrations. *Biol Trace Elem Res*, 18, 1-8.
- Shibata H, Akahane R, Honjoh T, Asano M, Mominoki K, Fujii K, Suzuki M, Ohtaishi N, Ishioka K, Ahmed M, Soliman M, Kimura K, Saito M, 2005: Seasonal changes in serum leptin of the feral raccoon (*Procyon lotor*) determined by canine- leptin-specific ELISA. *J Exp Zool*, 303, 7, 527-533.
- Shibata H, Sasaki N, Hondjoh T, Ohishi I, TakiguchiM, IshiokaK, Ahmed M, Soliman M, Kimura K, Saito M, 2003: Feline Leptin: Immunogenic and Biological Activities of the Recombinant Protein and Its Measurement by ELISA. *J Vet Med Sci*, 65, 11, 1207-1211.
- Striffer JS, Polansky MM, Anderson RA, 1998: Dietary chromium decreases insulin resistance in rats fed a high-fat mineral-imbanced diet. *Metabolism*, 4, 396-400.
- Sun C, Wang S, Xia W, Sun W, 2003: Effects of chromium and fish oil on blood lipid and blood glucose in obese rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 32, 2, 110-112.
- Sun C, Zhang W, Wang S, Zhang Y, 2000: Effect of chromium gluconate on body weight serum leptin and insülin in rats. *Wei Sheng Yan Jiu*, 29, 6, 370-371.
- Sunvold GD, 1998: The role of novel nutrient in managing obesity. Recent Advances in Canine and Feline Nutrition. In: Iams Nutrition Symposium Proceeding, Carey DP, Norton SA and Bolser SM eds. Wilmington OH, Orange Frazer Press, 2, 123-133.
- Uyanık F, 2001: The effects of dietary chromium supplementation on some blood parameters in sheep. *Biol Trace Elem Res*, 84, 93-101.
- World Health Organisation (WHO), 1996: Chromium. Genova, 155-159.
- Zha LY, Xu ZR, Wang MQ, Gu LY, 2007: Effects of chromium nanoparticle dosage on growth body composition serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, 85, 323-330.
- \*\* : Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (EUBAP VA-05-12) desteklenmiştir.

**\*Yazışma Adresi:** Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ  
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.  
e-mail: berrinkg@hotmail.com

## Detection of *Listeria monocytogenes* in Fried Fish, Processing Slab and Tools in Kwara State, Nigeria

Ibrahim ADESHINA<sup>1\*</sup>, Mozeedah ABDULWAHAB<sup>2</sup>, Yusuf Adetunji ADEWALE<sup>3</sup>,  
Sa'adu Bala SULEIMAN<sup>4</sup>, Lateef Oloyede TIAMIYU<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Aquaculture and Fisheries, University of Ilorin, Nigeria.

<sup>2</sup>Department of Zoology, University of Lagos, Nigeria.

<sup>3</sup>School of Life and Environmental Science, Faculty of Science, Engineering and Built Environment, Deakin University, Australia.

<sup>4</sup>Department of Fisheries, University of Maiduguri, Nigeria.

Received Date: 18.11.2016

Accepted Date: 22.02.2017

**Abstract:** This study investigated the prevalence of *Listeria monocytogenes* in fried fish, processing slab and tool in Kwara state, Nigeria. A total of 2400 fish samples, 800 slabs and 800 tool samples were collected aseptically using stratified sampling methods for *L. monocytogenes* analysis. The samples were cultured for *L. monocytogenes* using PALCAM and fraser selective agar and supplements. The isolates were characterized using both biochemical and molecular methods. The data obtained were subjected to descriptive statistics and chi-square test,  $P=0.05$ . The results have showed that 528 (22%), 313 (39.13%) and 195 (24.38%) of the fried fish, slab and tool samples are positive for *L. monocytogenes* respectively. Molecular characterization using PCR has shown that 25.87% of biochemically characterized isolates are identified as *L. monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* was identified in fried fish (12.88%), slab (36.41%) and tool (26.41%) samples. There was a significant difference between the occurrence of *L. monocytogenes* in fish, slab and tools. Fried fish, processing slab and tools were heavily contaminated with *L. monocytogenes*. Processing slab and tools were identified to be predisposing factors, and therefore calls for attentions.

**Keywords:** *Listeria Monocytogenes*, Infection, Prevalence, Fried fish.

### Nijerya'nın Kwara Eyaletinde Tüketime Sunulan Kızartılmış Balıklar ile Kullanılan İşleme Levhası ve Aletlerde *Listeria monocytogenes* Varlığının Belirlenmesi

**Özet:** Bu çalışmada Nijerya'nın Kwara eyaletinde kızartılmış balık, işleme levhası ve aletlerde *Listeria monocytogenes* prevalansı araştırılmıştır. *L. monocytogenes* analizleri için tabakalı örnekleme yöntemi kullanılarak aseptik olarak toplam 2400 balık örneği, 800 plaka ve 800 alet numunesi toplandı. Örnekler *L. monocytogenes* için PALCAM ve fraser selektif agar ve takviyeleri kullanılarak kültüre edildi. İzolatlar hem biyokimyasal hem de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile moleküler yöntemlerle karakterize edildi. Elde edilen veriler tanımlayıcı istatistik ve ki-kare testi ile analiz edildi. Sonuçlar, kızarmış balık işleme levhası ve alet örneklerinden sırasıyla 528 (%22), 313 (%39.13) ve 195'inin (%24.38) *L. monocytogenes* açısından pozitif olduğunu göstermiştir. Örneklerin PCR işlemi ile moleküler karakterizasyonunda, biyokimyasal olarak karakterize edilmiş izolatların %25.87'sinin *L. monocytogenes* olduğu tespit edilmiştir. Kızarmış balık (%12.88), işleme levhası (%36.41) ve aletlerden (%26.41) elde edilen izolatların *L. monocytogenes* olduğu belirlenmiştir. *L. monocytogenes* sıklığı açısından kızarmış balık, işleme levhası ve aletler arasındaki fark önemli bulunmuştur. Sonuç olarak, Nijerya'nın Ilorin şehrinde incelenen kızarmış balık, işleme levhası ve alet örneklerinin yüksek düzeyde *L. monocytogenes* ile kontamine olduğu tespit edilmiştir. İşleme levhaları ve aletleri predispozan faktörler olduğundan önem taşımaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Listeria monocytogenes*, Enfeksiyon, Prevalans, Kızartılmış balık.

## Introduction

Fish is highly nutritious and serves as major animal source of protein in developing countries like Nigeria. Fish is consumed in different forms such as fresh, smoked, fried or boiled. Fried fish also known as "ejadindin" is the most consumed processed fish in Nigeria. More so, fried fish is sold at lower price (as low as 5 naira equivalent to \$0.025) thereby accessible and affordable by many individuals. However, less attention is given to the quality and safety of the fried fish.

*Listeria monocytogenes* is a gram positive bacterium that can be found in a variety of foods and has ability to grow at the refrigerator temperature. It causes septicemia, central nervous system infection, intra-uterine infection, and meningitis in adults while new born babies and fetuses suffer from severe systemic infection (Hakim et al., 2015). Pregnant women infected with *L. monocytogenes* also show symptoms resembling to those of a mild influenza-like illness. Listeriosis

has been reported to be accounted for a mortality rate of about 20% to 50% (Acha and Szyfres, 2003; Chukwu, 2007; Rychli et al., 2014). During a listeriosis outbreak in 1985 in California State of United States of America, 52 deaths were reported by federal database (Eruteya et al., 2014). Between 1998 and 1999, at minimum, 14 people had been reported to have lost their life as a result of listeriosis outbreak from eating hot dogs in United States of America. In any case, about 13 people in eight states in United States of America have died from eating cantaloupe contaminated with *Listeria spp.* Miettinen (2006) reported that at least one out of six Americans is infected with *Listeria spp.* as a result of consumption of contaminated food on yearly bases. *Listeria* is accounted for about 500 death every year (Miettinen, 2006; Álvarez-Ordóñez et al., 2015). Almost all cases of human listeriosis are due to *L. monocytogenes* infection while infections due to *Listeria ivanovii* and *Listeria seeligeri* have also been described (Seeliger and Jones, 1986; Ieren et al., 2013). *Listeria monocytogenes* is psychrotrophic and halotolerant (de Simón et al., 1992). It can survive or even grow at pH values as low as 4.4 and at salt concentrations of up to 14%. As a consequence, it has been isolated from a variety of sources, including fish and fishery products (Els et al., 2004; Gudmundsdóttir et al., 2005; Karunasagar and Karunasagar, 2000; Nakamura et al., 2004; Katzav et al., 2004; Tocomo et al., 2014). Considerable contamination occurs during evisceration, fish handling and packing as a result of inadequate hygiene (Shen et al., 2013).

The U.S. Food and Drug Administration (FDA) maintains a zero tolerance policy (FDA and FSIS, 2003; Kamat and Nair, 1993) while EU legislation (no. 2073/2005) imposes a zero-tolerance policy in respect to certain foods destined for high-risk consumer groups and otherwise limits these bacteria to below 100 CFU/g (Jami et al., 2014). However, there is no report of outbreak in Nigeria yet but the listeriosis cases might have been unreported due to low level of awareness, education and health care facilities available in the country. Therefore, we aimed, in this study, to investigate the presence and prevalence of *Listeria* species in fried fish, processing slab and tool in Kwara state, Nigeria.

## Material and methods

**Study area and sample collection:** The study was carried out in Kwara State located in the North-central geopolitical zone of Nigeria. The state has sixteen (16) local government areas (LGAs) (KWSG, 2015). Fifty fried fish sellers were selected using stratified methods as described by Fagbenro and

Adebayo (2005). A total of 2400 fish samples consisting of 150 samples from 50 fried fish processors/sellers in each LGA as well as 800 slab and 800 tools samples were collected for the analysis (Swetha et al., 2012). Fish samples were collected in sterile bottles; swab and tools samples were collected by swabbing using swab stick and transported to the Department of Veterinary Microbiology and Parasitology, University of Ilorin for bacteriological study.

**Isolation of *Listeria* species:** For pre-enrichment one gram of tissue samples obtained from fried fish samples were incubated at 37 °C for 24 hours in universal bottles containing 9 ml of sterile half-Fraser broth and fraser supplement (Oxoid products SR0156). From the pre-enrichment culture media about 0.1 ml was transferred into 10ml of full strength Fraser broth with fraser supplements and was incubated at 37 °C for 24-48 hrs (secondary enrichment) (Rocourt et al., 2001). The culture media were then streaked on PALCAM prepared plates by using a wire loop and incubated at 37°C for 48 hrs. The wire loops were sterilized on spirit lamp for 60 seconds before usage. The plates with a black sunken centre and a black halo on a cherry-red background, following aesculin hydrolysis and mannitol fermentation were suspected to be colonies of listeria species and selected for further identification tests as adopted by (Eruteya et al., 2014). The suspected colonies were sub-cultured on PALCAM agar (Oxoid product CM0877) and incubated for 24-48 hours to obtain pure colonies.

**Macroscopic examination of culture plates:** The presumptive identification of *Listeria* species were based on the cultural and evidence of aesculin hydrolysis or black-halo formation on PALCAM plates. The suspected organisms were stored on glycerol slant and backup with slant of PALCAM, stored in a freezer and refrigerator respectively until use. Further test were carried out. The tests are: Gram stain reaction, Beta-haemolysis, catalase reaction, motility at room temperature, sugar or carbohydrate fermentation (Rhamnose, Xylose, Lactose, Fructose and Manitol).

**DNA extraction:** The *Listeria* species (isolates) were suspended in 1.5 ml of enriched fraser broths was grown on a shaker for 48 hours at 48 °C and pelleted by centrifugation at 6000 rpm (4600x g) for 5 min. The pellets were re-suspended in 520 µl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Fifteen microliters of 20% SDS and 3 µl of Proteinase K (20 mg/ml) were added. The mixture was incubated for 1 hour at 37 °C, then 100 µl of 5 M NaCl and 80 µL of a 10% CTAB solution in 0.7 M



NaCl were added and mixed. The suspension was incubated for 10 min at 65 °C and kept on ice for 15 min. An equal volume of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) was added, followed by incubation on ice for 5 min and centrifugation at 7200 x g for 20 min. The aqueous phase was transferred to a new tube, isopropanol (1:0.6) was added and DNA was precipitated at -20 °C for 16 h. DNA was collected by centrifugation at 7200 x g for 10 min, washed with 500 µl of 70% ethanol, air-dried at room temperature for approximately three hours and finally dissolved in 50 µl of TE buffer.

**Polymerase Chain Reaction (PCR):** PCR reaction mix consisted of 2.5 µl of 5x GoTaqgreen reaction buffer, 0.75 µl of MgCl<sub>2</sub>, 0.25 µl of 10 mM of dNTPs mix, 0.25 µl of 10 pmol each of forward and backwards haemolysis primer with forward primer =hlyA-F (target gene = hly; length = 24; primer sequence = 5'GCAGTTGCAAGCGCTTGGAGTGAA3 and amplification product = 456) and reverse primer=hlyA-R (target gene = hly; length = 24; primer sequence = 5'GCAACGTATCCTCCAGAGTGATCG 3 and amplification product = 456) and 0.06 µl of Taq DNA polymerase (8000U) (Promega, USA) made up to 10.5 µl with sterile distilled water then 2 µl DNA template. PCR carried out in a GeneAmp 9700 PCR System Thermalcycler (Applied Biosystem Inc., USA) as described by Swetha et al. (2012). The cycling condition for hlyA primer on a PCR profile were : initial denaturation 95 °C for 5 min, 35 cycles; final denaturation 94°C for 60 s; annealing 61 °C for 45 s and 72 °C for 60 s; a final extension at 72 °C for 7 mins and held chill at 4 °C (Swetha et al., 2012).

**Integrity:** The integrity of the amplified band for haemolysis gene fragment was checked on a 1.5% Agarose gel ran at 110V for about 1 hour to confirm amplification. Picture was taken under gel electrophoresis indicating amplification using haemolysis specific primer.

**Statistical analysis:** The data obtained from the experiment were subjected to descriptive statistics. The prevalence was compared using Chi-square test with the aid of SPSS statistical package version 20.

## Results

Figure 1 shows the black sunken centre and a black halo on a cherry-red background, following aesculin hydrolysis and mannitol fermentation of a typical listeria characteristics. Table 1 shows the result of the fried fish, working slab and tools samples examined for *L. monocytogenes*. Out of 2400 fried fish, 800 working slab and 800 tools examined, 528 (22%), 313 (39.13%) and 195 (24.38%) were positive for *L. monocytogenes* respectively. About 25.90% of the total samples examined were infected with *L. monocytogenes*.



Figure 1. Colony morphology of *Listeria* in PALCAM agar

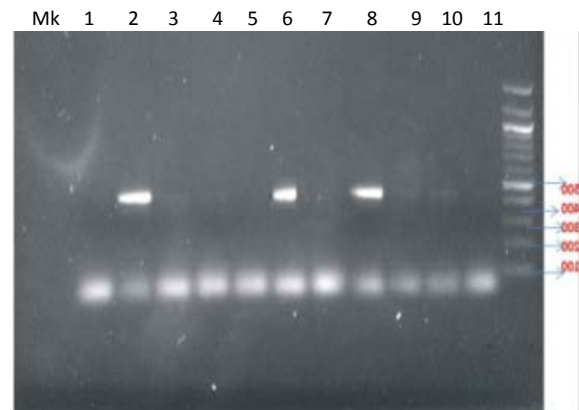


Figure 2. PCR gel of *L. monocytogenes* using hlyA primer Where: Lanes 4, 6 and 10 = positive amplified lanes for *L. Monocytogenes* Other lanes= non-amplified lanes.

**Table 1.** Occurrence of *L. monocytogenes* biochemically characterized from fried fish, working slab and tools in Kwara state

Samples	No. examined	Positive	Percentage	Intensity
Fish	2400	528	22.00	0.22
Slab	800	313	39.13	0.39
Tool	800	195	24.38	0.24
Total	4000	1036	25.90	0.26

The biochemically characterized isolates (n=1036) were further subjected to molecular characterization using PCR. About 25.87% were identified to be positive for *L. monocytogenes*. From fried fish samples, out of 528 isolates, 68 (12.88%) were confirmed. In working slab and tool 313 and

195 isolates were investigated molecularly and shown 129 (36.41%) and 71 (26.41%) to be *L. monocytogenes*. The intensity of infection was highest in slab (0.41) and lowest in fish (0.13) (Table 2).

**Table 2.** Molecular characterization of *L. monocytogenes* targeted at haemolyses gene (hlyA)

Sample	No. <i>L. spp.</i> (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)	Intensity	P-value
Fish	528 (22.00) <sup>a</sup>	68 (12.88) <sup>a</sup>	0.13	0.000
Slab	313 (39.13) <sup>b</sup>	129 (41.21) <sup>b</sup>	0.41	
Tool	195 (24.38) <sup>a</sup>	71 (36.41) <sup>c</sup>	0.36	
<b>Total</b>	<b>1036 (25.90)</b>	<b>268 (25.87)</b>	<b>0.27</b>	

Different superscripts in the same column refer to statistically significant (P<0.05) in prevalence

## Discussion

One of the characteristics of *L. monocytogenes* is that it is ubiquitous in nature which means it is capable of surviving in various environmental conditions including refrigerated temperatures that kill several other bacteria. Presence of *L. monocytogenes* in fried fish in this study was in accordance with the fact that it has ability to survive in processing rooms/equipments even under many cleaning processes as reported by Loncarevic et al. (1996) and Jørgensen and Huss (1998). The percentage of *L. monocytogenes* recorded in fish samples in this study was similar to 10% by Dauphin et al. (2001), 18% Gudbjörnsdóttir et al. (2004), 8% by Swetha et al. (2012), 13.33% Adeshina and Adewale (2015) and 17% by Ajaiyeoba et al. (2015) but lower than 100% reported by Autio et al. (1999), 22% by Johansson et al. (1999), 47% by Fonnesbech-Vogel et al. (2001), 25% by Salihu et al. (2008) and Amusan (2015). Furthermore, the findings of the present study were higher than the 1% recorded by Thimothe et al. (2004), 4% by Gudmundsdóttir et al. (2005) and 1.29% by Eruteya et al. (2014). The bacterium ability to persist in the processed food makes it a psychrotrophic pathogenic bacterium.

*Listeria monocytogenes* is heavily present in the processing tools (slab and cutlery) based on observation in this study. The result is in agreement with the findings of Cetinkaya et al. (2014) who reported 30% and 32% by Alvarez-Ordoriez et al. (2015) but lower than 71% recorded by Eklund et al. (1995) and 88% recorded by Ieren et al. (2013). More so, the result were higher than 15% reported by Johansson et al. (1999), 17% by Fonnesbech-Vogel et al. (2001), 1% by Hoffman et al. (2003) and 3% by Pusztahelyi et al. (2016). The differences in the values might be attributed the management practices such as cleaning. The higher value in this study further suggest that the level of hygiene of

the handlers since the *L. monocytogenes* is an ubiquitous which could found in many places and of course had being isolated from several materials. Proper cleaning and hygienically process fish could contain lower *L. monocytogenes*. In the developing nations like Nigeria, the level of cleaning and hygiene practices is lower compared to developed nations where most of the compared studies were carried out, thus, could be responsible for the variations in the values. The study did not investigated the cleaning and hygiene practices by the handlers but opined it could be responsible for the differences since *L. monocytogenes* is capable of survive wide range of environmental conditions including refrigerated temperature and ability to persist in a material during cleaning.

The results have showed that there is heavy presence of *L. monocytogenes* in fried fish, processing slab and tools. The results further suggest that processing slab and tools are predisposing factors in the prevalence of *L. monocytogenes* in Kwara state. More so, this further confirms that the bacteria can also enter to the product both during and after processing if the environment, tools and handlers are not kept hygienically. The fact that almost every household eats fried fish directly as source of protein makes it a concern in Nigeria. It is worth-noting that fried fish serves as a "bail-out" source of protein to much family whenever they have no meat in the pot. Children buy it at with little or no control. Hence, the presence of *L. monocytogenes* in the fish requires urgent attention to prevent listeriosis outbreak. Therefore, further study should be carried out to investigate the effect of cleaning and hygiene practices of the fish processors and handlers.

## References

- Acha PN, Szyfres B, 2003: Listeriosis. *Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals* 3<sup>rd</sup> ed. Washington D.C.: Pan American Health Organization, pp.179.
- Adeshina I, Adewale YA, 2015: Preliminary studies on the prevalence of *Listeria monocytogenes* IN *Clarias gariepinus* and *Oreochromis niloticus* in Ibadan, Oyo State, *J Agric Res Dev*, 14, 1, 45-51.
- Ajayeoba TA, Atanda OO, Obadina AO, Bankole MO, Adelowo OO, 2016: The incidence and distribution of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat vegetables in South-Western Nigeria. *Food Sci Nut*, 4, 1, 59-66.
- Álvarez-Ordóñez A, Leong D, Hickey B, Beaufort A, Jordan K, 2015: The challenge of challenge testing to monitor *Listeria monocytogenes* growth on ready-to-eat foods in Europe by following the European Commission (2014) Technical Guidance document. *Food Res Int*, 75, 233-243.
- Amusan EE, 2012: Detection of *Listeria monocytogenes* in frozen fish in Lagos, Nigeria, *Proceedings of the 27<sup>th</sup> Annual Conference and Biennial General Meeting of the Fisheries Society of Nigeria* held at Banguet Hall Government House/Faculty of Law, Niger-Delta University, Bayelsa State, 25<sup>th</sup>-30<sup>th</sup> November, pp.307-310.
- Autio T, Hielm S, Miettinen H, Sjöberg AM, Aarnisalo K, Björkroth J, Mattila-Sandholm T, Korkeala H, 1999: Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol*, 65, 150-155.
- Cetinkaya F, Mus TE, Yibar A, Guclu N, Tavsanli H, Cibik R, 2014: Prevalence, serotype identification by multiplex polymerase chain reaction and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *J Food Saf*, 34, 42-49.
- Chukwu OOC, 2007: Studies of *Listeria monocytogenes* (Bacterium) in some selected Local Government Areas of Plateau State, Nigeria, *Ph.D Thesis* submitted to Department of Botany, University of Jos, pp. 256.
- Dauphin G, Ragimbeau C, Malle P, 2001: Use of PFGE typing for tracing contamination with *Listeria monocytogenes* in three cold-smoked salmon processing plants. *Int J Food Microbiol*, 64, 51-61.
- De Simón M, Tarrag C, Ferrer MD, 1992: Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). *Int J Food Microbiol*, 16, 153-156.
- Eklund MW, Poysky FR, Paranjpye RN, Lashbrook LC, Peterson ME, Pelroy GA, 1995: Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants. *J Food Prot*, 58, 502-508.
- Els VC, Hadewig W, Marc H, Lieve H, Nancy R, 2004: Prevalence and Typing of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Food Products on the Belgian Market. *J Food Protect*, 67, 2480-2487.
- Eruteya OC, Odunfa SA, Lahor J, 2014: *Listeria* spp. in Raw Cow and Goat Meat in Port Harcourt. Nigeria, *B Biotech J*, 4, 2, 204-214.
- Fagbenro OA, Adebayo OT, 2005: A review of the animal and aquafeed in Nigeria. In A synthesis of the formulated animal and aquafeed industry in Sub-Saharan Africa. *CIFA Occasional*, 26, 2, 36.
- FDA and FSIS 2003: Quantitative Assessment of the Relative Risk to Public Health from Foodborne *Listeria monocytogenes* Among Selected Categories of Ready-to-Eat Foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>.
- Fonnesbech-Vogel B, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L, 2001: Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Appl Environ Microbiol*, 67, 2586-2595.
- Gudbjörnsdóttir B, Suihko ML, Gustavsson P, Thorkelsson G, Salo S, Sjöberg AM, Niclasen O, Bredholt S, 2004: The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiol*, 21, 217-225.
- Gudmundsdóttir S, Gudbjörnsdóttir B, Lauzon HL, Einarsson H, Kristinsson KG, Kristjánsson M, 2005: Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *Int J Food Microbiol*, 101, 41-51.
- Hakim AS, Abuelnaga AS, Ezz-Eldeen AM, Bakry MA, Ismail SA 2015: Prevalence of some food poisoning bacteria in local and imported retail pork by-products in Egyptian markets. *Afr J Microbiol Res*, 9, 1492-1498.
- Hoffman A, Gall KL, Norton DM, Wiedmann M, 2003: *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. *J Food Protect*, 66, 52-60.
- Iren I, Bello M, Kwaga J, 2013: Occurrence and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables and vegetable salads sold in Zaria, Nigeria. *Afr J Food Sci*, 7, 334-338.
- Johansson T, Rantala L, Palmu L, Honkanen-Buzalski T, 1999: Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and in a production plant. *Int J Food Microbiol*, 47, 111-119.
- Jørgensen LV, Huss HH, 1998: Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. *Int J Food Microbiol*, 42, 127-131.
- Kamat AS, Nair PM, 1993: Incidence of *Listeria* species in Indian sea foods and meat. *J Food Safety*, 2, 117-130.
- Karunasagar I, Karunasagar I, 2000: *Listeria* in tropical fish and fishery products. *Int J Food Micro*, 62, 177-181.
- Katzav M, Hyvönen P, Muje P, Rantala L, von Wright A, 2006: Pulsed-field gel electrophoresis Typing of *Listeria monocytogenes* isolated in Two Finnish Fish Farms. *J Food Protect*, 69, 1443-1447.

- Kwara State Ministry of Agriculture, Natural Resources and Rural Development (MANRRD) 2013: Agricultural business in Kwara State, A Report submitted to the Kwara State Government, pp.72.
- Loncarevic S, Tham W, Danielsson-Tham ML, 1996: Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in smoked and "gravad" fish. *Acta Vet Scand*, 37, 13-18.
- Miettinen H, 2006: *Listeria monocytogenes* if Fish Farming and Processing, *PhD Thesis*, University of Helsinki, Finland, 77.
- Nakamura H, Hatanaka M, Ochi K, Nagao M, Ogasawara J, Hase A, Kitase T, Haruki K, Nishikawa Y, 2004: *Listeria monocytogenes* isolated from cold-smoked fish products in Osaka city, Japan. *Int J Food Microbiol*, 94, 323-328.
- Pusztahelyi T, Szabó J, Dombrádi Z, Kovács S, Pócsi I, 2016: Foodborne *Listeria monocytogenes*: A Real Challenge in Quality Control, *Scientifica* 20, 16, 1-6.
- Rocourt J, Hogue A, Toyofuku H, Jacquet C, Schlundt J, 2001, *Listeria* and listeriosis: risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *Am J Infect Control*, 29, 225-227.
- Rychli K, Müller A, Zaiser A, Schoder D, Allerberger F, Wagner M, Scmitz-Esser S, 2014: Genome sequencing of *Listeria monocytogenes* "Quargel" listeriosis outbreak strains reveals two different strains with distinct *in vitro* virulence potential. *PLOS ONE* 9, 2, e89964.
- Salihu MD, Junaidu AU, Manga SB, Gulumbe ML, Magaji AA, Ahmed A, Adamu AY, Shittu A, Balarabe I, 2008: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in smoked fish in Sokoto, Nigeria. *J Biotech*, 7, 17, 3082-3084.
- Seeliger HPR, Jones D, 1986: Genus *Listeria*, In: Kandler O, Weiss N (Eds), *regula, nonsporulating Gram-positive rods*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> Ed. Williams and Wilkins. Baltimore. pp. 1235-1245.
- Shen J, Rump L, Zhang Y, Chen Y, Wang X, Meng J, 2013: Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiol*, 35, 58-64.
- Swetha CS, Madhava TR, Krishnaiah N, Vijaya KA, 2012: Detection of *Listeria monocytogenes* in fish samples by PCR assay. *Ann Bio Res*, 3 (4), 1880-1884.
- Thimothe J, Kerr Nightingale K, Gall K, Scott VN, Wiedmann M, 2004: Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. *J Food Protect*, 67, 328-341.
- Tocmo R, Krizman K, Khoo WJ, Phua LK, Kim M, Yuk HG, 2014: *Listeria monocytogenes* in Vacuum-Packed Smoked Fish Products: Occurrence, Routes of Contamination, and Potential Intervention Measures. *Comp Rev Food Sci Food Saf*, 13, 1735-1739.
- \*Corresponding Author:** Ibrahim ADESHINA  
Department of Aquaculture and Fisheries,  
University of Ilorin, Nigeria.  
e-mail:padibra4all@yahoo.co.uk

## Kırşehir İli Merkez İlçede Sığır Besiciliği Yapan İşletmelerin Ekonomik Analizi\*\*

Coşkun ÇELİK<sup>1</sup>, Savaş SARIÖZKAN<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, Türkiye.

<sup>2</sup>Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, Kayseri, Türkiye.

Geliş Tarihi: 29.11.2016

Kabul Tarihi: 06.03.2017

**Özet:** Bu çalışmada, Kırşehir İli Merkez İlçe'de sığır besiciliği yapan işletmelerin yapısal, teknik ve ekonomik özellikleri araştırılmıştır. Araştırmanın materyalini, ildeki sığır besi işletmeleri arasından tabakalı örnekleme yöntemi ile seçilen 45 adet işletmeden sağlanan veriler oluşturmuştur. İşletmeler ölçekleri itibarıyla; 1-20 baş hayvana sahip olanlar küçük ölçekli, 21-50 baş hayvana sahip olanlar orta ölçekli, 51-150 baş hayvana sahip olanlar da büyük ölçekli işletmeler olarak gruplandırılmıştır. Araştırmada maliyeti oluşturan masraf unsurlarının dağılımı incelendiğinde; besi materyalinin %42.95; yemin %33.09; işçiliğin %9.63; veteriner-sağlık giderlerinin %1.73; bakım-onarım %1.64; amortisman giderlerinin %1.56; diğer giderlerin %0,84 oranında olduğu tespit edilmiştir. İldeki sığır besiciliğinde besi başı canlı ağırlığı 215.2 kg, besi sonu canlı ağırlığı 464.7 kg ve ortalama besi süresi de 241.1 gün olarak bulunmuştur. Ortalama günlük canlı ağırlık artışı 1.033 g olarak hesaplanmıştır. Araştırma alanında, 1 kg canlı ağırlık artışı için 7.8 kg kesif yem tüketildiği tespit edilmiştir. Canlı ağırlık artış maliyeti küçük, orta ve büyük ölçekli işletmelerde sırasıyla 9.7 TL, 8.8 TL ve 7.8 TL olarak hesaplanmış ve aradaki fark önemli bulunmuştur (P<0.001). Sonuç olarak, büyük ve orta ölçekli işletmeler sırasıyla 606 TL/baş ve 132 TL/baş kâr elde ederken, küçük ölçekli işletmeler 492 TL/baş zarar etmişlerdir.

**Anahtar Kelimeler:** Sığır besiciliği, Ekonomik analiz, Teknik analiz, Kırşehir.

### Economic Analysis of Cattle Fattening Enterprises in the Centre of Kırşehir Province

**Abstract:** In this study, the structural, technical, economical characteristics of cattle fattening enterprises in central district of Kırşehir province were examined. The data used in the study obtained from randomly selected 45 cattle fattening enterprises in the province. The enterprises were grouped in to three categories, namely small scale (1-20 heads), medium scale (21-50 heads) and large scale (51-150 heads). The proportions of cost of feed, labour, vets-and-meds, depreciation-repair-maintenance and miscellaneous expenses in the total cost accounted for 42.95%, 33.09%, 9.63%, 1.73%, 1.64%, 1.56% and 0.84% respectively. The initial live-weight was 215.2 kg/head at the onset of fattening, 464.7 kg/head at the end of fattening. The average fattening period, daily live-weight gain and were calculated to be 241.1 days and 1.033 g/head respectively. In research area, it was determined that for 1 kg of live weight gain 7.8 kg concentrate feed was consumed. Cost of live weight gain for small scale, medium scale and large scale enterprises were calculated as 9.7, 8.8, 7.8 TL respectively and difference was statistically significant (P<0.001). As a result, the profit for large and medium scale enterprises were determined as 606 TL/head ve 132 TL/head respectively and, 492 TL/head negative profit determined for small scale enterprises.

**Keywords:** Cattle fattening, Economic analysis, Technical analysis, Kırşehir.

### Giriş

Sığır besiciliği, kasaplık hayvanların karkas verimi ve et kalitesinin yükseltilmesi yanında, çeşitli hayvan yemleri ve endüstri kalıntılarının daha iyi değerlendirilmesine olanak yaratması bakımından büyük önem taşıyan, aynı zamanda istihdam alanı yaratmak suretiyle ekonomiye büyük ölçüde katkıda bulunan bir işletme koludur (Sakarya ve Günlü, 1996; Polat, 1997). Başka bir tanımla sığır besiciliği; damızlık özelliği göstermeyen genç erkek ve dişiler ile süt sığırı işletmelerinde üretim dışı bırakılan düşük verimli ve yaşlı sığırlardan daha fazla miktarda ve daha kaliteli et elde edebilmek için bu hayvanlara kesimden önce belirli bir süre özel bir besleme uygulanması işlemidir (Arpacık, 1997). Bölgesel ve il bazında mikro düzeyde işletme koşullarının ele alınıp kaynakların yerinde incelenmesi anlayışı, kit olan üretim faktörlerinin yeterli ölçüde değerlendirilmesini, kullanımında varsa eksikliklerin belirlenip daha etkin hale getirilmesi ve

dolayısıyla verimliliğinin artırılmasını sağlayacaktır. Bu nedenle piyasa ekonomilerinde kalkınmada makro ekonomik yol gösterici planlar yanında, bölgesel veya yöresel plan ya da ekonomik araştırmaların önemi her geçen gün daha da artmaktadır (Sakarya, 1992; Cevger ve ark., 2003). Türkiye'de bugüne kadar sığır besiciliği işletmelerinde yapılan araştırmalarda daha çok yetiştiricilik, bakım besleme gibi besiciliğin teknik yönü incelenirken, işletmelerin mali analizinin yapıldığı, üretim ve pazarlama sorunlarına yönelik çalışmalara ise daha az rastlanmaktadır. Kırşehir ilinde sığır besi işletmelerini ekonomik açıdan araştıran bir çalışmaya da rastlanılmamıştır.

Bu düşüncelerden hareketle çalışmada, Kırşehir İli Merkez İlçe'de sığır besi işletmelerinin sosyo ekonomik yapılarının incelenmesi, üretim maliyetleri ile satış gelirlerinin tespit edilerek kârlılık

durumlarının ortaya konulması ve tespit edilen sorunlara çözüm önerileri getirilmesi amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Araştırmanın materyalini, Kırşehir/Merkez İlçede faaliyet gösteren sığır besi işletmelerinden yüz yüze görüşülerek anket uygulanarak tabakalı tesadüfi örnekleme yöntemiyle seçilen toplam 45 adet işletmenin 2011-2012 faaliyet yıllarına ilişkin verileri oluşturmuştur. İşletmeler, ölçeklerine göre küçük (1-20 baş), orta (21-50 baş) ve büyük (51-150 baş) olmak üzere 3 alt gruba ayrılmıştır. Minimum örnek sayısının tespitinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Yamane, 1967; Yıldırım, 2000).

Araştırmada olası aksaklıklar göz önüne alınarak 41 olan minimum örnek sayısının %10 fazla işletme ile yani toplam 45 işletme ile anket yapılmıştır. Araştırma kapsamına alınan işletmelerde her bir masraf unsurunun ve gelirlerin tespitinde aşağıdaki yöntemler izlenmiştir (Çiçek, 2002).

**Besi Materyali Maliyeti:** Besi sığırlarının işletmeye ulaşıncaya kadar, satın alma bedellerine ulaştırma masraflarının da eklenmesiyle bulunmuştur. Besi materyali işletme içinden sağlanmışsa, avlu maliyeti (işletme içi üretim değeri) değeri dikkate alınmıştır.

**Yem Giderleri:** Besi süresince tüketilen yemlerde satın alınanların alım bedellerine nakliye masraflarının eklenmesiyle, üretilenlerin ise avlu fiyatı dikkate alınarak hesaplanmıştır. Kaba ve kesif yem giderleri toplam yem masraflarını oluşturmuştur.

**İşçilik Giderleri:** Besi süresince aile ve yabancı işgücü ücretlerinin toplamından oluşmuştur. Aile işgücünde, işletme faaliyetine aktif olarak katılan aile bireyi, yabancı işgücünde ise çalışan işçi sayıları dikkate alınarak yetişkin erkek işgücü birimi üzerinden ilgili yıldaki asgari ücret baz alınarak hesaplanmıştır.

**Veteriner-Sağlık Giderleri:** İşletme sahiplerinin beyanları esas alınarak, veteriner hekim muayene ücretleri, aşılamalar ve ilaçlar için yapılan harcamaların toplamından oluşmuştur.

**Yabancı Sermaye Faizi:** Besi dönemi için kullanılan kredinin yasal banka faizi beyanları, Ziraat Bankasının besicilik için verdiği kredi faizleriyle kontrol edilerek hesaplara katılmıştır.

**Diğer Giderler:** İşletmelerde kullanılan elektrik, su, akaryakıt ve nakliye giderlerinin toplamından oluşmuştur. Ayrıca bu grubun içerisine kesim masrafları, nakliye ve park-pazar masrafları da; belgelere dayalı olarak hesaplamaya dahil edilmiştir.

**Genel İdare Giderleri:** Masraflar toplamının %3'ü olarak kabul edilmiştir (Açıl, 1977).

**Amortismanlar:** İşletme binalarının inşaat bedelleri veya iktisap değerleri üzerinden betonarme olanlar için %2, geleneksel tipte olanlar için %4 amortisman oranı üzerinden eşit aralıklı amortisman yöntemi ile hesaplanmıştır (Aras, 1959). Alet ve ekipman amortismanlarının hesaplanmasında ise, Kabukçu (1976)'nun bildirdiği yöntemden yararlanılmıştır.

**Bakım-Onarım Giderleri:** Hesaplama bina, alet ve ekipmanın bakım ve onarım giderleri üreticinin beyanı dikkate alınarak yapılmıştır. Bunun mümkün olmadığı durumda bina iktisap bedelinin %1'i bakım, %2'si onarım bedeli olarak hesaplara dahil edilmiştir (Açıl, 1977). Tali gelirlerin ve maliyetlerin hesaplanması ise aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

**İskarta Hayvan Geliri:** Besi süresince değişik nedenlerle elden çıkartılan besi hayvanlarından sağlanan gelirlerin toplamından oluşmuştur.

**Gübre Geliri:** Besinin yapıldığı yıldaki gübre fiyatları dikkate alınarak, elde edilen gübre tahminlerine göre oluşmuştur.

**Masraflar Toplamı:** Besi materyali, yem, işçilik, veteriner hekim, aşı ve ilaç masrafları, faiz ve diğer giderler toplamından oluşmuştur.

**Masraflar Genel Toplamı:** Masraflar toplamı ile genel idare giderleri, amortismanlar ve bakım-onarım masrafları toplanarak elde edilmiştir.

**Tali Gelir Toplamı;** İskarta hayvan geliri ve gübre gelirleri toplamından oluşmuştur.

**Toplam Maliyet:** Masraflar genel toplamından tali gelirler toplamının çıkartılmasıyla elde edilmiştir.

**1 Kg. Karkas Maliyeti:** Toplam maliyetin besi sonu toplam karkas ağırlığına bölünmesiyle bulunmuştur.

**Net Kar/Zarar:** Toplam gelirden toplam maliyetin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır.

İşletmelerdeki işgücü varlığı, yetişkin erkek işgücü birimine çevrilmiştir (Çiçek, 2002; Aydın ve Sakarya, 2012). Veriler ortalama  $\pm$  standart hata  $\bar{X} \pm S \bar{x}$  olarak verilmiştir.

Araştırma verileri SPSS 11.5 programı ile değerlendirilmiş ve işletme ölçekleri arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda Varyans Analizi (Anova) testi kullanılmıştır. Gruplar arası farkın önem kontrolünde ( $P < 0.05$  düzeyinde) Duncan testinden yararlanılmıştır. Minimum örnek sayısının tespitinde aşağıdaki formülden yararlanılmıştır (Yıldırım, 2000).

$$n = \frac{N \cdot \Sigma(Nh \cdot Sh^2)}{N^2 \cdot D^2 + \Sigma(Nh \cdot Sh^2)}$$

Bu formülde;

**n:** Örnek büyüklüğü,

**N:** Populasyondaki birim sayısı,

**Nh:** h'nci tabakadaki birim sayısı,

**Sh<sup>2</sup>:** h'nci tabakanın varyansı,

$$D^2 = (d^2 / z^2),$$

**d:** Araştırmacı tarafından kabul edilebilecek maksimum hata miktarı veya örnek ortalaması ile populasyon ortalaması arasındaki fark(%10 olarak alınmıştır=3.1),

**z:** Bu hata payına göre standart normal dağılım tablosundaki z değeridir (%90 güven aralığında z değeri 1.645'dir).İşletmelerin ölçekler itibariyle dağılımı ve örneklem sayısı Tablo 1'de verilmiştir.

**Tablo 1.** Sığır besi işletmelerinin ölçeklere göre dağılımı ve örneklem sayısı

İşletme Ölçeği	İşletme Sayısı (adet)	Minimum Örneklem Sayısı	Yapılan Anket Sayısı*	İşletme Başına Düşen Sığır Sayısı (baş)
Küçük	143	21	23	10.0
Orta	93	13	14	34.2
Büyük	48	7	8	86.5
Toplam	284	41	45	30.8

## Bulgular

**1. Üreticilerin Sosyo-Ekonomik Özellikleri:** Araştırmada küçük ölçekli işletmelerin yarısından fazlasının (%52.2) 2000 yılından önce kerpiç ve taş duvardan kurulduğu, orta ve büyük işletmelerin ise %80-85 oranında 2000 yılından sonra kurulduğu ve daha yeni, betonarme ve modern ahırlar olduğu tespit edilmiştir. Küçük ölçekli işletmelerde sığır besiciliği büyük oranda (%69.7) ek iş olarak yapılırken, orta ölçeklilerde mecburiyetten (%71.4) yapıldığı tespit edilmiş, büyük ölçekli işletmelerde ise kârlı olduğu için tercih edenlerin oranı %50

olarak bulunmuştur. İşletmeler ortalamasında ise besiciliğin en yüksek tercih nedeni (%42.2) ek iş olarak beyan edilmiştir (Tablo 2). Ancak yapılan hesaplamada, ek iş yapan işletme sahipleri hayvan başına 371.69 TL/baş zarar ederken; besicilik dışında bir iş yapmayanların net kârı 76.77 TL/baş olarak tespit edilmiştir (Tablo 3). Genel olarak işletme sahiplerinin besiciliği sürdürme eğiliminde olduğu ancak, küçük ölçekli işletmelerden 4 (%17.39) işletme sahibinin besiciliği bırakmayı düşündüğü belirlenmiştir.

**Tablo 2.** İşletme sahiplerinin sığır besiciliği yapma nedenleri ve yüzde oranları

Sığır Besiciliği Tercih Nedeni	Küçük (%)	Orta (%)	Büyük (%)	Genel (%)
Kârlı olduğu için (Tek gelir kaynağı)	21.7	28.6	50.0	28.9
Ek iş	69.7	0.0	37.5	42.2
Başka iş yapamadığı için (mecburiyet)	8.6	71.4	12.5	28.9

Bölgede besi sistemi olarak en fazla kapalı-bağlı sistemin tercih edildiği (%60), besi materyalinin yerel hayvan pazarlarından temin edildiği (%64.4), besi sonrası satışların daha çok kombina/mezbahalar aracılığıyla (%84.5) ve partiler halinde yapıldığı (%64.4) ve örgütlülüğün düşük seviyede olduğu (%40) tespit edilmiştir. Bir kooperatife/birliğe üye olan işletmelerde 188.7 TL/baş gelir sağlanırken, üye olmayan işletmelerde 296.8 TL/baş zarar edilmiştir. Kırşehir ilinde sığır besiciliğinde genellikle Holştayn, Esmer ve Simental hayvanlar ile bunların melezlerinin kullanıldığı görülmüştür. İşletmelerin çok az bir kısmında ise yerli ırka (%6.7) rastlanmıştır. İşletmelerin %80'i yılda bir, %17.8'i yılda iki ve %2.2'i de yılda üç dönem besi yaptıklarını beyan etmiştir. İşletmelerin karşılaştıkları güçlükler arasında; üretim maliyetleri dikkate alınmaksızın oluşan

düşük alım fiyatları (%62.2), vadelerin uzun oluşu (%22.2), aracı sayısının çok olması (%8.9), uygulanan stopaj ve vergilerin yüksek oluşu (%4.5) ile alıcı sayısının azlığından kaynaklanan alım tekeli (%2.2) olarak sıralanmıştır.

Üreticilerin ortalama yaşı küçük, orta ve büyük ölçekli işletmelerde sırasıyla 44.6, 45.0 ve 43.0 olarak bulunmuştur. İşletme sahiplerinin birbirine yakın, orta yaş grubunda olduğu ve özellikle küçük ölçekli işletme sahiplerinin diğerlerine göre besicilik tecrübesinin nispeten az olduğu görülmektedir. Sadece küçük ölçekli bir işletme dışında diğer işletme sahipleri en az bir diplomaya sahip iken, küçük ölçekli işletmelerde üniversite mezunu, büyük ve orta ölçekli işletmelerde ise okuma-yazma bilmeyen yönetici yoktur (Tablo 4). Eğitim düzeyi arttıkça işletme kârlılığının da arttığı ve en yüksek

kârın üniversite mezunu işletme sahipleri tarafından sağlandığı tespit edilmiştir (Tablo 5). İşletmelerde işgücü varlığı Erkek İşgücü Birimi (EİB) üzerinden

hesaplanmış, küçük, orta ve büyük işletmelerde sırasıyla 1.11, 2.19, 2.98 EİB, işletmeler ortalamasında 1.76 EİB bulunmuştur.

**Tablo 3.** Ek iş yapan/yapmayan işletmelerde elde edilen net kâr/zarar miktarları (TL/baş)

Ek İş Durumu	Toplam Gelir	Toplam Maliyet	Net Kâr/Zarar
Yapan	4.243.99	4.615.68	-371.69
Yapmayan	4.052.94	3.976.17	76.77

**Tablo 4.** İşletme sahiplerinin yaşı, tecrübesi ve eğitim durumu.

Yaş	Küçük (%)	Orta (%)	Büyük (%)	Genel (%)
21-40	52.2	28.6	50.0	44.5
41-50	13.0	35.7	37.5	24.4
51- +	34.8	35.7	12.5	31.1
<b>Tecrübe</b>				
1-10	30.0	21.0	0.0	22.0
11-20	48.0	36.0	62.5	47.0
21-35	22.0	43.0	37.5	31.0
<b>Eğitim Durumu</b>				
Okur-yazar değil	4.3	0.0	0.0	2.2
İlkokul	52.2	50.0	12.5	44.5
Ortaokul	26.1	28.6	37.5	28.9
Lise	17.4	14.3	37.5	20.0

**Tablo 5.** İşletmelerin eğitim durumuna göre hayvan başına elde ettiği net kâr/zarar (TL/baş).

Eğitim Durumları	Toplam Gelir	Toplam Maliyet	Net Kâr/Zarar
Okur-yazar değil	4.956	5.317	-360
İlkokul	3.924	4.260	-336
Ortaokul	4.381	4.308	72
Lise	4.202	4.124	78
Üniversite	3.803	3.392	410

**2. Üretime İlişkin Teknik Bulgular:** İncelenen işletmelerde besiye alınan hayvanların tamamına yakını yaklaşık 8 aylık (241.1 gün) besi süresinden sonra satılmakta ve ortalama 1.000 gramın üzerinde (1.027-1.049 g) günlük canlı ağırlık artışı sağlanmaktadır. Besiye alınan hayvanların %1.1'i besiyi çeşitli nedenlerle (zorunlu kesim, ölüm, erken satış vs.) tamamlayamamıştır (Tablo 6). İncelenen işletmelerde 1 kg canlı ağırlık artışı için tüketilen kesif yem miktarı, küçük ölçekli işletmelerde 9.3 kg, orta ölçekli işletmelerde 7.9 kg, büyük ölçekli işletmelerde de 7.2 kg ve işletmeler ortalamasında 7.8 kg olarak tespit edilmiştir. Kaba yemin başta arpa samanı olmak üzere, kuru ot ve yoncadan oluştuğu; az da olsa mısır silajının rasyona katıldığı görülmüştür.

**3. Üretime İlişkin Ekonomik Bulgular:** İşletmeler genelinde üretim masrafları toplamı 152.816.40

TL'dir. Bu değer %93.98'ini değişken masraflar, %6.02'sini ise sabit masraflar oluşturmaktadır. Toplam üretim masrafları içerisinde %42.95'lik oran ile besi materyali maliyeti ilk sırada yer alırken, bunu sırasıyla %33.09 ile yem (kesif+kaba) maliyeti, %9,63 ile işçilik (aile+yabancı) maliyeti ve %5.74 ile yabancı sermaye faizi izlemektedir. Hayvan başına düşen üretim masrafları toplamı ise 4.231.97 TL'dir (Tablo 7). İncelenen işletmelerde hayvan başına üretim maliyetleri dikkate alınarak 1 kg canlı ağırlık artış maliyeti hesaplanmıştır. Besi sonu toplam maliyet küçük ölçekli işletmelerde (4.682.72 TL/baş) önemli oranda daha fazla bulunurken ( $P<0.001$ ), 1 kg canlı ağırlık artış maliyeti büyük ölçekli işletmelerde 7.76 TL/baş ile önemli düzeyde düşük çıkmıştır ( $P<0.001$ ). Besi sonu ortalama canlı ağırlık yönünden işletme ölçekleri arasında herhangi bir fark tespit edilememiştir ( $P>0.05$ ; Tablo 8).



**Tablo 6.** Üretim faaliyetine ilişkin teknik bulgular

Teknik Parametreler	Küçük	Orta	Büyük	Ortalama
Besiye Alınan Hayvan Sayısı (Baş)	13.9	38.5	97.8	36.5
Besi Sonu Satılan Hayvan Sayısı (Baş)	13.7	37.9	97.2	36.1
Besi Başı Canlı Ağırlık (kg)	221.9	211.7	201.8	215.2
Besi Sonu Canlı Ağırlık (kg)	482.6	441.7	453.7	464.7
Canlı Ağırlık Artışı (kg/Baş)	260.6	230.0	251.8	249.5
Besi Süresi (Gün)	253.7	219.2	243.1	241.1
Günlük Canlı Ağırlık Artışı (g)	1.027	1.049	1.036	1.033

**Tablo 7.** İşletmelerde maliyeti oluşturan masraf unsurları ve dağılımı

Masraf Unsurları (TL)	Toplam Masraflar (TL)	%	Hayvan Başına Düşen Masraflar (TL/baş)
1. Besi Materyali Maliyeti	65.645.45	42.95	1.817.93
2. Toplam Yem Masrafı	50.562.67	33.09	1400.24
a. Kesif Yem Masrafı	38.202.57	25.00	1.057.95
b. Kaba Yem Masrafı	12.360.10	8.09	342.29
3. İşçilik	14.716.99	9.63	407.56
a. Yabancı İşgücü	13.963.01	9.12	386.68
b. Aile İşgücü	753.98	0.51	20.88
4. Veteriner-Sağlık Masrafları	2.640.36	1.73	73.12
5. Kredi Faizi	8.765.70	5.74	242.75
6. Diğer Giderler*	1.290.93	0.84	35.75
Değişken Masraf Toplamı	143.621.70	93.98	3.977.34
7. Genel İdare Giderleri	4.308.65	2.82	119.32
8. Amortismanlar	2.384.70	1.56	66.04
9. Bakım-Onarım Giderleri	2.501.34	1.64	69.27
Sabit Masraf Toplamı	9.194.70	6.02	254.63
Masraflar Genel Toplamı	152.816.40	100.00	4.231.97

\*Elektrik-su, kesim, park-pazar masrafı dahildir.

**Tablo 8.** İncelenen işletmelerde toplam ve canlı ağırlık artış maliyeti

İşletme Ölçekleri	Besi Sonu Toplam Maliyeti (TL/Baş)	Besi Sonu Canlı Ağırlığı (kg/baş)	Canlı Ağırlık Artış Maliyeti (TL/kg)
Küçük	4.682.72±157.1 <sup>a</sup>	482.61±16.4	9.70±0.3 <sup>a</sup>
Orta	3.898.18±119.9 <sup>b</sup>	441.79±20.4	8.82±0.2 <sup>a</sup>
Büyük	3.520.19±104.4 <sup>b</sup>	453.75±16.2	7.76±0.1 <sup>b</sup>
P	<0.001	>0.05	<0.001

İncelenen işletmelerin toplam geliri, besiye alınan hayvanların mezbahada kesim sonrası karkas ağırlığı üzerinden satışı ile elde edilmektedir. Besiye alınan hayvan başına net kâr/zarar, toplam gelirden toplam maliyetlerin çıkarılması ile hesaplanmıştır. Hayvan başına elde edilen toplam gelir yönünden

ölçekler arasında fark bulunmazken ( $P>0.05$ ), toplam maliyet küçük ölçekli işletmelerde daha fazla bulunmuştur ( $P<0.001$ ). Dolayısıyla, orta ve büyük ölçekli işletmeler kâr elde ederken, küçük ölçekli işletmeler zarar etmişlerdir ( $P<0.001$ ; Tablo 9).

**Tablo 9.** Hayvan başına düşen toplam gelir, maliyet ve net kâr/zarar (TL/baş)

Ekonomik Gösterge	Küçük	Orta	Büyük	Ortalama	P
Toplam Gelir*	4.190±140	4.030±155	4.126±194	4.129±91	>0.05
Toplam Maliyet*	4.682±157 <sup>a</sup>	3.898±119 <sup>b</sup>	3.520±104 <sup>b</sup>	4.231±114	<0.001
Net Kâr/Zarar*	-492±169 <sup>b</sup>	132±126 <sup>a</sup>	606±120 <sup>a</sup>	-102±115	<0.001

## Tartışma ve Sonuç

Kırşehir Merkez'de sığır besiciliği yapan üreticilerin ortalama yaşı ve tecrübelerine (17 yıl) ait değerler, Antakya ve Bayburt illerinde yürütülen çalışmalarla sonuçlarıyla oldukça paralellik göster-

mektedir (Özkan, 2003; Çağı, 2006). İncelenen işletme yöneticilerinden en az bir diplomaya sahip olanların oranı (%97.8), bazı çalışmalara yakın (Çağı, 2006; Yücel, 2007), bazılarında ise (Fidan, 1992;

Gündoğmuş, 1998) yüksek bulunmuştur. Yüksek olmasında mevcut çalışmanın literatüre göre daha güncel olması ve zorunlu eğitim süresinin artmış olması gösterilebilir. İşletme sahiplerinin eğitim durumlarına göre elde edilen net kâr miktarı, en fazla üniversite mezunlarında (410.14 TL/baş) tespit edilmiş bunu lise (78.09 TL/baş) ve ortaokul mezunları (72.45 TL/baş) takip etmiştir. Bu sonuç, eğitim düzeyinin işletme kârlılığında etkili bir faktör olduğunu göstermektedir. Diğer taraftan, besicilik dışında ek iş yapan işletme sahipleri zarar (-371.69TL/baş) ederken, asıl gelir kaynağı besicilik olanlar kârlı (76.77 TL/baş) çalışmıştır. İşletme sahiplerinin besicilik dışında ek iş yapmaları, bu iş koluna yeterli emek, zaman harcamadıklarını ve uzmanlaşamadıklarını göstermekte ve doğal olarak işletme sonuçlarına olumsuz yansımaktadır. İncelenen işletmelerden kooperatif veya birliğe üye olanların oranı (%40), Özkan (2003)'ün çalışmasından düşük, Eren (2006)'in çalışmasıyla uyumludur. Kooperatife veya birliğe üye olan işletmelerin net kârı, üye olmayan işletmelere göre daha yüksek bulunmuştur. Üreticilerin ekonomik çıkarlarını koruyan, gözetken yeterli düzeyde ve etkin bir örgütlenme ile girdi temininden satış aşamasına kadar pazarlık gücü artmakta ve kârlılık olumlu yönde etkilenmektedir.

Farklı illerde yapılan çalışmalara benzer olarak Kırşehir'de de besi materyali temini önemli oranda (%64.4) mahalli pazarlardan yapılmaktadır (Çiçek, 2002, Çağı, 2006; Hazneci, 2007). Yüksek verimlilik ve başarılı bir besicilik faaliyeti için besiyeye alınacak hayvanların sağlıklı olması, ırkı, cinsiyeti ve yaşı besi performansında önemli bir etkiye sahiptir (Topçu ve Demir, 2005). İncelenen işletmelerin %60'ı besi sistemi olarak "kapalı-bağlı" ahır sistemini tercih etmiş ve bu oran, Çağı (2006)'nın çalışmasının verilerine kıyasla oldukça düşük bulunmuştur (%80.9). Son yıllarda Türkiye genelinde olduğu gibi araştırma bölgesinde de daha az yatırım sermayesi gereken açık veya yarı açık ahırların giderek yaygınlaştığı görülmektedir. Besi süresi işletmeler genelinde 241.11 gün (yaklaşık 8 ay) olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda optimum besi süresi, kültür melezi hayvanlarda 180-210 gün, yerli ırk besi hayvanlarında ise 105 gün olarak bildirilmektedir (Gündoğmuş ve ark., 1998). Beside günlük besi giderinin (marjinal maliyetin), günlük canlı ağırlık artışı değerine (marjinal hasıla) eşit olduğu zaman besiyeye son verilmelidir (Sakarya ve Günlü, 1996). Besi olgunluğuna ulaştıktan ve optimum besi süresi geçirildikten sonra veya erken kesimlerde büyük kaynak kayıpları ortaya çıkmaktadır (Gardner ve ark., 2012). Tespit edilen besi süresi bazı çalışmalardan yüksek (Çiçek, 2002; Gündoğmuş, 1993; İmik ve ark., 2000; Karkacıer, 1991; Sakarya ve Günlü, 1996; Uğurtaş, 2008); bazı

çalışmalardan düşük (Altuntaş ve Arpacık, 2004; Hazneci, 2007); bazı çalışmalara da yakın bulunmuştur (Erkuş ve ark., 1990; Yücel, 2007). Besi süresinin farklılığı, hayvana ait olan faktörlerin yanında büyük oranda fiyatlardan etkilenmektedir.

İşletmeler besi sonunda hayvanları büyük oranda kombinalara (%84.5) satmaktadır. İlde tek alıcı pozisyonundaki kombinaların, üretim maliyetleri dikkate alınmaksızın oluşturduğu düşük alım fiyatları (%62.2) üreticileri pek tatmin etmemektedir. Bunun yanında vadelerin uzun oluşu (%22.2), aracı sayısının çok olması da üreticileri zor duruma sokmaktadır (%8.9).

İl genelinde besiyeye alınan hayvanların ortalama besi başı canlı ağırlık değeri (215.2 kg) önceki araştırma sonuçlarına göre; Arpacık ve ark. (1994)'dan oldukça yüksek, İmik ve ark (2000) ile Uğurtaş (2008)'in çalışmalarından düşük bulunurken; Çiçek (2002) ve Yücel (2007)'e yakın bulunmuştur. Yapılan bazı çalışmalarda sığır besiciliğinde besi başı canlı ağırlığın ve kesim sonrası karkas ağırlığının (randıman) işletme karlılığı üzerinde önemli etkisi olduğu tespit edilmiştir. Besiyeye alınacak hayvanın besi başı ağırlığı Esmer ırk erkek danalar için ortalama 100 kg, Simental ırk erkek danalar için 135 kg olduğu (Arpacık ve ark., 1994) ve bu ırk için besi başlangıcı için en uygun yaştan 6 ay olduğu (Altuntaş ve ark., 2004) bildirilmiştir. Bu bilgilerden yola çıkarak Merkez ilçede besi başı canlı ağırlığının kârlı ve verimli bir sığır besiciliği için nispeten fazla olduğu görülmektedir. İşletmeler ortalamasında günlük canlı ağırlık artışı (1.033 gr), büyük ve orta ölçekli işletmelerde daha yüksek çıkmıştır. Bu işletmelerin besi hayvanı olarak yerli ırk tercih etmemeleri, besi başı canlı ağırlığını düşük tutmaları, bakım-besleme şartlarının iyiliği ile eğitim ve tecrübe konularındaki avantajlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Tespit edilen günlük canlı ağırlık artışı değeri, Kabukçu (1976) ile Akbulut ve ark. (1995)'nin bildirdiği değerlerden yüksek, Arpacık ve ark. (1994) ve Özkan (2003)'ün çalışmalarına yakın, Başpınar ve ark. (1999) ve Çiçek (2002)'in çalışmalardan ise düşük bulunmuştur.

İşletmelerde kesif yem olarak; özellikle sığır besi yemi yanında, arpa ve kepek; kaba yem olarak; arpa-buğday samanı, az miktarda kuru ot ve yonca kullanıldığı görülmüştür. Tüketilen kesif yem miktarı en yüksek küçük ölçekli işletmelerde, en düşük büyük ölçekli işletmelerde tespit edilmiştir. Büyük ölçekli işletmelerde besi başı canlı ağırlığının düşük olması, kesif yem oranının da daha az çıkmasında etkili olmuştur. Bu durum besi başı canlı ağırlık arttıkça, bir kg canlı ağırlık artışı için tüketilen yem miktarının da arttığını belirten araştırmalarla paralellik göstermektedir (Arpacık ve ark., 1984; Arpacık ve ark., 1994). Tüketilen ortalama kesif yem miktarı (7.8 kg/gün), yapılan bazı çalışmalarda

uyumlu (Çiçek, 2002; Sakarya ve Günlü, 1996; Uğurtaş, 2008), Fidan (1992)'in bildirdiği 2.8 kg ve Özkan (2003)'ün bildirdiği 6.4 kg'dan yüksek, Köknaroğlu ve ark. (2006)'ın bildirdiği 9.9 kg'dan düşük bulunmuştur.

İşletmelerde maliyeti oluşturan masraf unsurlarının dağılımı incelendiğinde; besi materyali maliyetinin (%42.95) işletme ölçeklerine paralel olarak artma eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Buna neden olarak, işletme ölçekleri küçüldükçe özellikle işçilik ve sabit masrafların nispi olarak artması ve daha fazla hayvanın besi materyali olarak satın alınması gösterilebilir. Besi materyali masraf oranı, İmik ve ark (2000), Çiçek (2002), Aydın ve Sakarya (2012)'nin bildirdiği değerlerden düşük (sırasıyla %51.13, %53.57, %50.56), Gündoğmuş (1993) ve Uğurtaş (2008)'in çalışmalarına yakın, Özkan (2003) ve Yücel (2007)'in araştırmalarından yüksektir (sırasıyla %35.8, %36.2). Literatür bilgilerdeki farklılıklarda; çalışmaların yapıldığı dönem, bölge, besi süresi, canlı hayvan fiyatlarındaki değişiklikler ve benzeri faktörlerin etkili olduğu söylenebilir. Üretim masrafları içerisinde ikinci sırayı alan yem masraflarının oranı (%33.1); Yücel (2007) ve Uğurtaş (2008)'in çalışmalarıyla uyumlu, İmik ve ark (2000), Özkan (2003) ve Aydın ve Sakarya (2012)'nin bildirdiği değerden yüksek olduğu görülmüştür. Yüksek çıkmasının nedeni çalışmaların yapıldığı dönemlerde yem fiyatlarındaki artışların, canlı hayvan alım fiyatlarındaki artışlardan hızlı ve daha yüksek olması olabilir. Besicilik faaliyetinde ve maliyet üzerinde etkili faktörlerden olan ortalama işgücü varlığı işletme ölçeklerine paralel olarak artmakla beraber işletmeler ortalamasında 1.76 EİB'dir. Bu değer Yücel (2007)'in değerleriyle uyumlu; Topçu (2004), Hazneci (2007) ve Uğurtaş (2008)'in araştırmasından düşük bulunmuştur. Düşük çıkmasında besicilik faaliyetleri ile uğraşan nüfusun kırsaldan kente göç etmesi ve nispeten işletme ölçeklerinin büyümüş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İşçilik giderinin oransal değeri (%9.6); İmik ve ark (2000), Çiçek (2002), Yücel (2007) ve Uğurtaş (2008)'in çalışmalarından yüksek; Aydın ve Sakarya (2012)'nin çalışmasından düşük bulunmuştur. İşletme ölçekleri büyüdükçe işçilik maliyet oranının düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum, büyük işletmelerde işgücünün daha verimli kullanılması ile açıklanabilir. EİB üzerinden çalıştırılan işçi sayılarına göre; küçüklerde 9 hayvana 1 işçi bakarken, orta ölçeklilerde 16 hayvana, büyüklerde 29 hayvana bir işçi bakmaktadır. İşletmelerin veteriner-sağlık giderleri işletmeler ortalamasında %1.7 olarak hesaplanmış ve ölçekler arttıkça bu giderin oransal olarak azaldığı tespit edilmiştir.

Hayvan başına elde edilen gelir yönünden ölçekler arasında fark bulunmazken, küçük ölçekli işletmelerde toplam maliyetlerin önemli oranda

fazla olması, küçük işletmelerin diğerlerinin aksine ölçeğin artan veriminden yararlanamayıp zarar etmelerine neden olmuştur. Bu durum, işletmelerde maliyetlere hâkim olmanın çok önemli olduğu ve bunu başaramayanların zarar ettiği şeklinde açıklanabilir. Küçük ölçekli işletmelerde zarar edilmesi ve buna rağmen işletmelerin üretime devam etmeleri; amortisman gibi sabit gider harcamasının o dönem için nakit olarak yapılmaması ve aile işgücüne ücret tahakkuk ettirmemeleri ile açıklanabilir. İşletme sahiplerinin besiciliğe devam etme eğilimi (%91.1) Çiçek (2002)'in çalışmasından yüksek bulunmuştur. Çiçek (2002)'in çalışmasının yapıldığı dönemde ekonomik kriz olması bu farklılığın nedeni olarak düşünülmüştür. İlin mevcut arazisi içinde mera alanlarının yeterli düzeyde olmaması üreticileri genellikle kesif yemle besiciliğe zorlamakta ve üretim masraflarını yükseltmektedir. Maliyetlerin düşürülebilmesi için, doğal dengeyi de koruyarak etkin bir mera düzenleme ve ıslah programı uygulanmasının yanı sıra yem bitkileri üretimi de artırılmalıdır.

Sonuç olarak, Kırşehir il ekonomisinde sığır besiciliği faaliyetinin önemli bir yeri vardır. Bu faaliyetin daha bilimsel temellere dayalı, ihtisaslaşmanın sağlandığı rasyonel işletmecilik anlayışıyla yapılması ilin ekonomik gelişmesinde önemli katkılar sağlayacaktır.

## Kaynaklar

- Açıl AF, 1977: Tarımsal Ürün Maliyetlerinin Hesaplanması ve Memleketimizde Tarımsal Ürün Maliyetlerindeki Gelişmeler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Yayın No: 665. Şark Matbaası, Ankara.
- Akbulut Ö, Tüzemen N, Aydın R, 1995: Esmer ve siyah-alaca tosunların açık ahırlarda besi performansı ve karkas özellikleri. *Tübitak Doğa-Veteriner Hayvanlık Dergisi*, 19, 1, 409-416 ve 423-427.
- Altuntaş M, Arpacık R, 2004: Farklı yaşlarda besiye alınan simental tosunların besi performansı ve optimum kesim ağırlıkları. *Lalahan Hayvanlık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 44, 1, 7-16.
- Aras A, 1959: Ziraatte Kıymet Takdiri ve Amortisman Metotları. Ayyıldız Matbaası, Ankara.
- Arpacık R, Erdiñç H, Çelebi Can A, Oğan M, 1984: Esmer ırk erkek danalarının yarı açık ahır şartlarında optimum kesim ağırlıklarının tayini. *Lalahan Hayvanlık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 24, (1-4), 34-49.
- Arpacık R, Nazlıgöl A, Beyhan Z, Atasoy F, 1994: Esmer ırk danalarda besi başı ağırlığının besi performansı ve besi ekonomisine etkisi. *Lalahan Hayvanlık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 34, (1-2), 79-89.
- Arpacık R, 1997: Entansif Sığır Besiciliği. Şahin Matbaası, 2. Basım, Ankara.
- Aydın E, Sakarya E, 2012: Kars ve Erzurum illeri entansif sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18, 6, 997-1005.

- Başpınar H, Oğan M, Balcı F, 1999: Polonya Holştayn erkek danaların besi performansı ve karkas özellikleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 39, 2, 1-6.
- Cevger Y, Sariozkan S, Aral Y, 2003: Kırıkkale ilinin sosyo-ekonomik kalkınmasında hayvancılık sektörünün yeri ve önemi. 21. Yüzyılın Başında Kırıkkale Sempozyumu. 10-11 Haziran 2003, Kırıkkale.
- Çağrı U, 2006: Antakya yöresi besi sığırcılığı işletmelerinin bilimsel değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, MKÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, Hatay.
- Çiçek H, 2002: Afyon ili sığır besi işletmelerinde karlılık ve verimlilik analizleri. AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara.
- Eren E, 2006: Kahramanmaraş İli Göksun ilçesinde sığır besiciliği yapan işletmelerin yapısı ve sorunları. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş.
- Erkuş A, Özçelik A, Gündoğan T, Turan A, 1990: Siyah Alaca sığırlarının besisinde optimal besi süresinin tespiti. *Çiftçi ve Köy Dünyası Dergisi*, 6, 72, 18-27.
- Fidan H, 1992: Çorum ilinde sığır besiciliği yapan tarım işletmelerinin ekonomik analizi ve hayvansal ürünlerin maliyet unsurlarının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gardner BA, Northcutt SL, Dolezal HG, Gill DR, Ray FK, Morgan JB, Shearhart, CW, 1996: Factors Influencing Profitability of Fedlot steers. Erişim: [http://www.ansi.okstate.edu/research/1996rr/28.pdf.]. Erişim tarihi: 21 Eylül 2012.
- Gündoğmuş E, Tanrıvermiş H, Kılıç O, 1998: Ankara ili koşullarında açıkta sığır besiciliğinde optimum besi süresi ve yem giderlerinin minimizasyonu üzerine bir araştırma: TKV çubuk örnek besi işletmesi örneği. *Üçüncü Sektör Kooperatifçilik Dergisi*, 120.
- Gündoğmuş E, 1993: Ankara ili çubuk ilçesi sığır besiciliği işletmelerinin ekonomik analizi. Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hazneci K, 2007: Amasya ili suluova ilçesinde sığır besiciliği yapan işletmelerin etkinlik analizi. Yüksek Lisans Tezi, OMÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun.
- İmik H, Günlü A, Tekerli M, Koçak S, 2000: Afyon ilinde yapılan sığır besiciliğinin ekonomik analizi ve kârlı bir besicilik için alınması gerekli önlemler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 40, 2, 1-15.
- Kabukçu MA, 1976: Elazığ ili şeker şirketi besi bölge şeffliğin yönetilen sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi. Fırat Üniversitesi Doçentlik Tezi, Elazığ.
- Karkacier O, 1991: Tokat-Turhal sığır besiciliği işletmelerinin ekonomik analizi. Doktora Tezi, EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü. Bornova-İzmir.
- Köknaoroğlu H, Yılmaz H, Demircan V, 2006: Afyon ili besi sığırcılığı işletmelerinde kesif yem oranının besi performansı karlılığı etkisi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 1, 1, 41-51.
- Özkan U, 2003: Bayburt ili'nde sığır besiciliğine yer veren tarım işletmelerinin ekonomik analizi. Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Polat BK, 1997: Ankara ili sığır besi işletmelerinde kârlılık ve verimlilik analizleri. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sakarya E, Günlü A, 1996: Limuzin x Jersey (F1) melezi ve holştayn ırkı tosunlarda optimal besi süresinin tespiti üzerine bir araştırma. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 43, 113-120.
- Sakarya E, 1982: Eskişehir ili sığır besi işletmelerinde besi maliyet ve karlılıkları üzerine bir araştırma, Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Topcu Y, Demir N, 2005: Functional analysis of fattening farms: the case of Erzurum province. *Journal of Applied Science*, 5, 6, 1071-1077.
- Topcu Y, 2004: Erzurum ili sığır besiciliği işletmelerinde girdi kullanımı ve üretim maliyeti üzerine bir araştırma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35, (1-2), 65-73.
- Uğurtaş FT, 2008: Konya ili Beyşehir ilçesi Doğanbey beldesinde sığır besiciliğine yer veren tarım işletmelerinin ekonomik analizi, Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Yamane T, 1967: Elementary Sampling Theory, Printice-Hall Inc., New York, 405.
- Yıldırım İ, 2000: Van İli Merkez İlçede sığır besiciliği işletmelerinin ekonomik analizi, YYÜ Ziraat Fakültesi, Yayın No: 20.
- Yücel S, 2007: Ankara ili tarım işletmelerinde sığır besiciliği üretim faaliyetlerinin teknik ve mali analizi, Yüksek Lisans Tezi, AÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

\*\* : Bu çalışma, aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

**\*Yazışma Adresi:** Savaş SARIOZKAN

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı,  
Kayseri, Türkiye.  
e-mail: ssariozkan@erciyes.edu.tr

## Laktasyondaki İneklerde Tohumlama Anında Azaltılan GnRH Dozunun Gebelik Oranı Üzerine Etkisi\*\*

Ramazan SERTKOL<sup>1</sup>, Mustafa Kemal SARIBAY<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye.

<sup>2</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

Geliş Tarihi: 12.12.2016

Kabul Tarihi: 17.02.2017

**Özet:** Çalışma laktasyondaki ineklerde tohumlama anında uygulanan GnRH dozunun yarıya indirilmesinin gebelik oranı üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Araştırmada yaşları 3-6 arasında değişen, postpartum 80-120 günler arasında olan ve klinik olarak herhangi bir reproduktif probleme rastlanılmayan 50 Holsteyn ırkı inek kullanıldı. İneklerin östrüs göstermeleri için herhangi bir hormonal uygulama yapılmadı. Çalışma süresince östrüs belirtileri gösteren ineklerin ovaryum muayeneleri 6-8 MHz lineer problu real-time ultrason ile yapıldı ve ovaryumdaki mevcut foliküllerin çapı kaydedildi. Daha sonra bir gruba (grup I, n=25) suni tohumlama (ST) anında bir gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogu olan Buserelin asetat (Receptal®, İntervet) 2.5 mL kas içi uygulandı. Diğer gruba (grup II, n=25) ise ST anında 1.25 mL Buserelin asetat kas içi uygulandı. Folikül çapları grup I ve II'de sırasıyla 12.28±0.37 mm, 12.24±0.44 mm olarak kaydedildi. Gebelik oranları grup I ve II'de sırasıyla %80 (20/25), %72 (18/25) olarak belirlendi (P>0.05). Sonuç olarak, ineklerde gebelik oranlarının artırılması amacıyla ST sırasında uygulanan GnRH'nin dozunun yarıya indirilmesinin gebelik oranlarını etkilemediği görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** İnek, GnRH, Gebelik oran.

### The Effect of Reduced Dose of GnRH Administered at the Time of Insemination on Pregnancy Rate in Lactating Dairy Cows

**Abstract:** This study was carried out to determine the effect of reducing half dose of GnRH performed immediately at the time of artificial insemination on pregnancy rate in lactating dairy cows. The study was conducted on 50 Holstein cows aging between 3-6 years old, and on 80-120 days postpartum without reproductive problems. No hormonal application was carried out for ensuring estrous in cows. The ovarian examinations of the cows showing estrous symptoms were performed by real-time ultrasound with 6–8 MHz lineer probe and the diameters of the follicles were recorded. The cows in Group I (n=25), a gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogue, buserelin acetate (Receptal®, İntervet) recieved 2.5 ml of GnRH intramucularly just at the time of artificial insemination. Group II recieved 1.25 mL of GnRH, intramuscularly immediately at the same time. The diameters of follicles at the time of inseminations were detected as 12.28±0.37 mm, 12.24±0.44 mm in the group I and group II respectively. The pregnancy rates were 80% (20/25) and 72% (18/25), in group I and group II respectively (P>0.05). It was concluded that reducing the half dose of GnRH, which is performed to increase the pregnancy rate in cows immediately at the time of insemination, did not affect the pregnancy rate.

**Keywords:** Cow, GnRH, Pregnancy rate.

### Giriş

İneklerde fertilizasyonun şekillenmemesinin en başta gelen nedenlerinden bazıları; ovulasyon gecikmesi, ovulasyondan sonra yapılan tohumlama ve anovulasyondur. Östrüs semptomları sona erdikten sonra 8-12 saat içerisinde ovulasyon gerçekleşmiyor ve bu süre 24 hatta 48 saati buluyor ise o zaman geciken bir ovulasyon söz konusudur. Ovulasyonun geciktiği durumlarda, ovum yaşlanmakta ve fertilizasyon kabiliyeti azalmaktadır. Ovulasyon mekanizmasındaki bozukluklar çoğunlukla hormonal kaynaklıdır (Dinç, 1990; Hartigan, 1995; King, 1991; Kimura ve ark., 1987; Lafi ve Kaneene, 1988). Dominant folikül (DF) preovulatör seviyeye ulaştığında, östradiolün pozitif feedback etkisi ile yeni bir GnRH salınımı uyarılır, GnRH hipofiz ön

lobuna etki ederek lüteinleştirici hormon (LH) salınımını stimule eder, LH'nin etkisiyle de oositin son olgunlaşması ve ovulasyon şekillenir. Bu süreçte bir aksama şekillenir, preovulatör östradiol, GnRH ve dolayısıyla LH salınımını uyarmada yetersiz kalırsa bunun sonucunda DF ovule olmaz. İlaveten, GnRH üretimi ya da salınımındaki bozukluklar sonucu da preovulatör LH piki şekillenmez (Alaçam, 1999; Dinç, 1990; İleri ve ark., 1993; Lucy ve ark., 1992).

Gonadotropin salınım hormonu ve analogları ineklerde, ovulasyon öncesi LH pikinin başlatılarak ovulasyonu sağlamak, ovulasyon gecikmesi ve anovulasyon sorunlarının azaltmak, luteolizisi baskılamak veya inhibe etmek suretiyle korpus luteumun

(KL) salgıladığı progesteron hormonu konsantrasyonunu yükseltmek, tohumlama sonrası luteal dönemde aksesör korpus luteum oluşumunu uyarmak ve sonuç olarak gebe kalma oranlarını artırmak için sahada yaygın olarak kullanılmaktadır (Peters, 2005; Schneider ve ark., 2006; Taponen ve ark., 1999). Thatcher ve ark. (1993) GnRH'nın oosit maturasyonunu etkileyerek fertiliteye olumlu katkısının olduğunu belirtmişlerdir. Phatak ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada, tohumlama ile birlikte kas içi yoldan 100 µg GnRH uygulanan ineklerde gebelik oranını %47.0, kontrol grubunda ise %37.7 olarak bulmuşlardır. Anjum ve ark. (2010) 64 inekte yaptıkları çalışmalarında, hayvanları iki eşit gruba ayırdıklarını, tedavi grubuna tohumlama anında GnRH uyguladıklarını, diğer grubu ise kontrol grubu olarak kullandıklarını ve hiçbir uygulama yapmadıklarını, sonuçta GnRH kullanılan grupta %68.75, kullanılmayan grupta ise %37.5 gebelik oranı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışma gebelik oranlarının artırılması amacıyla ST sırasında uygulanan GnRH'nın dozunun yarıya indirilmesinin gebelik oranları üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapıldı.

## Materyal ve Metot

Çalışma, Hatay ilinde, kayıtların düzenli olarak tutulduğu, serbest sistem yarı açık ticari süt ineği işletmesinde gerçekleştirildi. Hayvanlara kaba yem olarak işletmede bulunan kuru ot ve mısır silajı ile birlikte by-pass protein düzeyi yüksek olan %20 ham protein (HP) içeriğine sahip konsantre yem, karıştırılıp mix rasyon olarak verilmiştir. Kaba yem, konsantre yem oranı kuru madde bazında çalışmanın başlangıcında %60 kaba yem, %40 konsantre yem olacak şekilde düzenlenmiş, süt veriminin artışı ile birlikte bu oran eşit seviyeye getirilmiştir. Çalışmanın materyalini yaşları 3-6 arasında değişen, postpartum 80-120 günler arasında olan ve klinik olarak herhangi bir reproduktif probleme rastlanılmayan, vücut kondüsyon skorları ortalama 2.5-3.0 civarında 50 Holstayn ırkı inek oluşturdu. Çalışmada ineklerin östrüs göstermeleri için öncesinden herhangi bir hormonal uygulama yapılmadı. Çalışma süresince östrüs belirtileri gösteren (başka bir inek üzerine atladığı zaman hareketsiz duran, diğer ineklere atlayan ve/veya vulvasını koklayan ve/veya vulvasından çara gelen) ineklerin ovaryum muayeneleri 6-8 MHz lineer problu real-time ultrason (Falko, Pie Medical, Netherlands) ile transrektal olarak yapıldı ve ovaryumdaki mevcut folikülün çapı kaydedildi. Daha sonra bir gruba (grup I, n=25) ST anında bir GnRH analogu olan Buserelin asetat (Receptal®, 0.004 mg Buserelin/mL, Intervet) 2.5 mL kas içi uygulandı. Diğer gruba (grup II, n=25)

ise ST anında 1.25 mL buserelin asetat kas içi uygulandı. Suni tohumlamaların tamamı östrüs belirtileri başladıktan 12 saat sonra aynı veteriner hekim tarafından yapıldı. İneklerin gebelik muayeneleri tohumlama sonrası 35. günde transrektal ultrasonografi ile yapıldı.

Elde edilen gebelik oranları Ki-Kare testi ile analiz edilirken, verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildikten sonra grupların folikül çaplarının karşılaştırılmasında t-testi kullanılmıştır. Analizler için SPSS 14.0 paket programından yararlanılmıştır. Veriler Ort±SE olarak gösterilmiştir.

## Bulgular

Suni tohumlama anındaki folikül çapları grup I ve II'de sırasıyla 12.28±0.37 mm, 12.24±0.44 mm olarak belirlendi (Tablo 1). Gebelik oranları grup I ve II'de sırasıyla %80 (20/25), %72 (18/25) olarak belirlendi. Elde edilen gebelik oranları Tablo 2'de sunulmuştur. Çalışmada follikül çapı ve gebe kalma oranı bakımından gruplar arasında istatistiki bir fark tespit edilmemiştir (P>0.05). Çalışmanın yapıldığı yıl itibarıyla tek bir hayvanda buserelin asetatın tam doz yani 2.5 ml uygulanmasının maliyeti 10 TL, ilacın dozu yarıya düşürüldüğünde ise 5 TL olarak belirlendi.

**Tablo 1.** Tohumlama anındaki folikül çapları

Gruplar	Folikül çapı (mm)
Grup I	12.28±0.37
Grup II	12.24±0.44
P Değeri	0.141

**Tablo 2.** Elde edilen gebe kalma sayısı ve oranları

Gruplar	Gebelik, n	Gebelik, %
Grup I	20/25	80
Grup II	18/25	72
P Değeri	0.371	

## Tartışma ve Sonuç

Ovaryan folikülün, GnRH uygulamasıyla ovule olup olmayacağı, granüloza hücrelerindeki LH reseptörlerinin ekspresyonuyla ilişkilidir. Luteinleştirici hormon reseptörlerinin, foliküler dalganın ortaya çıkmasından 3 gün sonra, folikül deviyasyon noktasına ulaştığında yani dominant folikül 8.5 mm çapına ulaştığı zaman ortaya çıktığı ifade edilmektedir (Ginther ve ark., 1996; Martinez ve ark., 1999). Dominant folikülün çapı 9-10 mm'ye ulaştığında folikül içi östradiol-17β düzeyi artarak FSH salınımı baskılanmakta, LH reseptörleri artmaktadır. Bu dönemde luteal regresyon oluşursa, kan progesteronun düzeylerinin düşmesine bağlı olarak LH salınımı artmakta ve dominant folikül ovule

olmaktadır. Dolayısıyla çapı 9-10 mm'ye ulaşan dominant folikül ovule olma yeteneğine sahip olduğundan GnRH ve analogları, ovulasyonun uyarılması amacıyla kullanılabilir (Arthur ve ark., 1989; Lucy ve ark., 1992; Jainudeen ve ark., 2000). Sunulan çalışmada ST anındaki folikül çapları grup I ve II'de sırasıyla  $12.28 \pm 0.37$  mm,  $12.24 \pm 0.44$  mm olarak belirlendi ve dominant foliküllerin GnRH'a yanıt vermeme riski elemine edildi.

İneklerde ST ile birlikte yapılan GnRH uygulamasının gebelik oranlarını önemli oranda artırdığı bilinmektedir (Pursley ve ark., 1997; Peters, 2005). GnRH, ovulasyonu uyararak amacıyla östrüsün başlangıcında, ST'den 5-6 saat önce veya ST sırasında kullanılabilir Endojen LH salınımı, östrüs süresi ve ovulasyon arasındaki kronolojik ilişki, spermatazoon ve oositin yaşama süresi göz önüne alındığında, GnRH'nın ST sırasında veya 6 saat öncesinde yapılması önerilir (Kimura ve ark., 1987; Rosenberg ve ark., 1991; Taponen, 2003). Mee ve ark. (1990)'da östrüsün doğru tespitinin GnRH uygulamalarına yanıt alınmasında önemli olduğunu ifade etmişlerdir. Ekzojen GnRH uygulaması, beklenen LH dalgasından önce yapılırsa yani ovulasyonun erken indüksiyonu luteal fonksiyonun kışalmasına yol açar dolayısıyla da fertilitiyi olumsuz etkiler (Taponen, 2003). Pursley ve ark. (1995) çalışmalarında ovulasyonun erken indüksiyonun daha küçük foliküllerin ovule olmasına neden olduğuna dikkat çekmişlerdir. Metöstrüs evresinde GnRH enjeksiyonu yapılması ise, izleyen luteal fonksiyonu etkilemekte ve progesteron seviyesinde azalmaya neden olmakta fertilitiyi olumsuz etkileyebilmektedir. Macmillan ve ark. (1986) tohumlamadan 1-3 gün sonra GnRH enjeksiyonu yaptıkları çalışmalarında gebelik oranının %10.9 oranında azaldığını, Rodger ve Stormshak (1986) ve Martin ve ark. (1990) tohumlamadan 2 gün sonra GnRH enjeksiyonu yaptıkları çalışmalarında izleyen luteal evrede daha düşük progesteron seviyesi olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada her iki grupta da suni tohumlamalar ve GnRH enjeksiyonları, östrüs belirtileri (başka bir inek üzerine atladığı zaman hareketsiz duran, diğer ineklere atlayan ve/veya vulvasını koklayan ve/veya vulvasından çara gelen) başladıktan 12 saat sonra yapıldı. İlaveten ovaryum muayeneleri de yapıldı.

Hailu ve ark. (2015) 66 inekte yaptıkları çalışmada, hayvanları 3 gruba ayırdıklarını, tohumlama anında kas içi, 1.gruba 20 µg buserelin asetat, 2. gruba 10 µg buserelin asetat ve 3. gruba herhangi bir uygulama yapmadıklarını, gebelik oranlarının sırasıyla 1, 2 ve 3. grupta %68, %59 ve %32 olduğunu bulmuşlar, GnRH uygulamasının tohumlamada gebelik oranını artırdığını ve tam doz GnRH grubunda yarım doz uygulanan gruptan daha

yüksek gebelik oranı belirlemişlerdir. Srivastava ve Kharche (2002) tarafından ineklerde, ST anında 20 µg dozda buserelin uygulanan grupta %40 gebelik, 10 µg uygulanan grupta %28, elde etmişlerdir ve 20 µg GnRH enjeksiyonu yapılan grupta daha yüksek gebelik oranı elde edildiği rapor edilmiştir. Rastegarnia ve ark. (2004) mandalarda yaptıkları çalışmalarında, 50 ve 100 µg Gonadorelin uyguladıklarını, ovulasyon oranlarının 100 µg uygulanan grupta daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Kharche ve Srivastava (2007) döl tutmayan ineklerde 3 grup hayvanda yaptıkları çalışmada tohumlama anında 20 µg, 10 µg buserelin asetat ve kontrol grubuna fizyolojik tuzlu su verdiklerini ve gebelik oranlarını sırasıyla %45, %25 ve %17 olarak saptadıklarını, sonuç olarak GnRH uygulamasının gebelik oranlarını artırdığını ( $P < 0.05$ ) savunmaktadırlar. Karaca ve ark. (2009) laktasyondaki ineklerde ovsynch protokolü sırasında azaltılan GnRH dozunun ovulatör folikül çapı, ovulasyon oranı ve gebe kalma üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla düzenlediği çalışmalarında, bir gruba 10.5 µg, diğer gruba 5.25 µg GnRH enjekte ettiklerini, sonuç olarak ovulatör folikül çaplarında, ovulasyon oranlarında ve gebe kalma oranlarında farklılık bulunmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada gebelik oranları grup I ve II'de sırasıyla %80 (20/25), %72 (18/25) olarak belirlendi. Tohumlamalar sonucu elde edilen gebelik oranları yüzdesi arasındaki farklılıklarda ki-kare yöntemiyle istatistik olarak değerlendirildi ve iki grup arasındaki fark önemsiz olarak ( $P > 0.05$ ) olarak tespit edildi.

Fricke ve ark. (1998) iki grup hayvanda yaptıkları ovsynch çalışmasında, bir GnRH analogu olan cystorelin'i bir gruba 100 µg, diğer gruba ise 50 µg uyguladıklarını, her iki grupta da benzer LH aktivitesi elde ettiklerini, dozun yarıya düşürülmesinin ovulasyon oranlarını ve gebelik oranlarını etkilemediğini, sonuçta inek başına 6.40 dolar ilaç tasarrufu sağladıklarını ifade etmektedirler. Benzer bir çalışmada, Yamada ve ark. (2002) postpartum 40-150. günler arasındaki 114 inekte yaptıkları ovsynch çalışmasında, hayvanları iki gruba ayırdıklarını, bir gruba bir GnRH analogu olan fertirelin'i 100 µg, diğer gruba ise 50 µg dozunda uyguladıklarını, gebelik oranlarını sırasıyla %59.5, 61.1 olarak elde ettiklerini, GnRH dozunun yarıya indirilmesinin gebe kalma oranlarını etkilemediğini ve ilaç maliyetinin düşürülmesine olanak sağladığını tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada ise tek bir hayvanda buserelin asetatın tam doz yani 2.5 ml uygulanmasının maliyeti 10 TL, ilacın dozu yarıya düşürüldüğünde ise bu maliyetin 5 TL olduğu görüldü. Postpartum 60. güne kadar olan ineklerde veya sebebi kesin olarak saptanamayan infertilite olgularında, tohumlama anında yapılan GnRH enjeksiyonlarında dozun artmasına paralel olarak

ovulasyon gecikmesi ve anovulasyon gibi sorunlardan önemli oranda korunulabileceği, gebe kalma oranının artabileceği belirtilmektedir. Fakat hormonal dengenin oluşmaya başladığı postpartum 10-12. haftadan sonra ve herhangi bir reproduktif sorunu belirlenemeyen ineklerde, tohumlamayla birlikte uygulanan GnRH enjeksiyonlarında dozun artırılmasının gebelik oranlarını önemli bir şekilde yükseltmediği ifade edilmektedir (Alaşam ve ark., 1986; Grunert ve ark., 1978; Lee ve ark., 1983). Çalışmadaki ineklerin postpartum 80. gün ve sonrasında olması ve herhangi bir reproduktif problemlerinin olmaması, GnRH dozunun yarıya düşürülmesine rağmen gruplar arasında fark çıkmamasının nedeni olabilir.

Sonuç olarak ineklerde gebelik oranlarının artırılması amacıyla ST sırasında uygulanan GnRH'nin dozunun yarıya indirilmesinin gebelik oranlarını etkilemediği görüldü. İneklerde tohumlama anında yapılan GnRH enjeksiyonu ek bir ilaç masrafı olarak düşünülebilir fakat bu uygulamanın gebelik oranlarının artırılmasında katkısı olduğu varsayılmaktadır. Çalışmanın GnRH uygulamalarının maliyetini azaltarak yaygınlaşmasında katkıda bulunacağı düşünüldü.

## Kaynaklar

- Alaşam E, T Tekeli, Gökçay Y, 1986: Sütçü ineklerde gonadotropin salgılayıcı hormon (gnrh) enjeksiyonu ile gebelik oranlarının yükseltilmesi üzerinde çalışma. *Eurasian J Vet Sci*, 2, 1, 27-35.
- Alaşam E, 1999: İnekte infertilite sorunu. Alınmıştır "Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite", Ed; Alaşam E, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Anjum IA, Usman RH, Tunio MT, Abro SH, 2010: Improvement of conception rate in crossbred cattle by using GnRh analogue therapy. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 43, 1, 6-10.
- Arthur GH, Noakes DE, Pearson H, 1989: Veterinary Reproduction and Obstetrics (Theriogenology), 6<sup>th</sup> ed, Bailliere Tindall, London.
- Dinç DA, 1990: Döl Tutmayan (Repeat Breeder) Hayvanlar. Alınmıştır "Evcil Hayvanlarda Reproduksiyon, Suni Tohumlama, Obstetrik ve İnfertilite", Ed; Alaşam E, Nurol Matbaası, Ankara.
- Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC, 1998: Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 50,1275-1284.
- Ginther OJ, Wiltbank MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K, 1996: Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 55, 1187-1194.
- Grunert E, Tholen I, Goldbeck U, 1978: Influence of synthetic gonadotropin releasing hormone on the effectiveness of artificial insemination in cows. *Blue Book*, 28, 313-324.
- Hailu B, Gebrekidan B, Raju S, Birhanu A, Tadesse G, 2015: Effects of gonadotropin releasing hormone analogue in enhancements of pregnancy in repeat breeding dairy cows in and around Mekelle, Tigray, Ethiopia. *Anim Vet Sci*, 3, 1, 12-17.
- Hartigan PJ, 1995: Cattle breeding and infertility. In "Animal Breeding and Infertility", Blackwell Science, London, 86-168.
- İleri K, Ak K, Pabuççuoğlu S, Usta S, 1998: Reproduksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniv. Vet. Fak. Yayınları, No: 84, 139-145.
- Jainudeen MR, Wahid H, Hafez ESE, 2000: Reproduction and Farm Animals. In: Reproductive cycles, cattle and water buffalo. 7<sup>nd</sup> ed., A Wolters Kluwer, Company, Philadelphia.
- Karaca F, Doğruer G, Sarıbay MK, Ergün Y, Ateş CT, 2009: Laktasyondaki ineklerde ovsinör protokolünde azaltılan gnrh dozunun ovulatör follükül çapı, ovulasyon oranı ve gebe kalma oranı üzerine etkisi. V. Ulusal Reproduksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi. pp: 102-103, Elazığ, Türkiye,.
- Kharche SD, Srivastava SK, 2007: Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows. *Anim Reprod Sci*, 99, 1-2, 196-201.
- Kimura M, Nakoo T, Moriyoshi M, Kawata K, 1987: Luteal Phase deficiency as a possible cause of repeat breeding in dairy cows. *Br Vet J*, 143, 6, 560-566.
- King WA, 1991: Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. *Can Vet J*, 32, 99-103.
- Lafi SQ, Kaneene JB, 1988: Risk factors and associated economic effect of the repeat breeder syndrome in dairy cattle. *Veterinary Bulletin*, 58, 891-903.
- Lee CN, Maurice E, Pennington JA, Hoffman WF, Brown MD, 1983: Efficacy of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum and repeat breeder dairy cows. *Am J Vet Res*, 44, 2160-2163.
- Lucy MC, Savio JD, Badinga L, De La Sota RL, Thatcher WW, 1992: Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J Anim Sci*, 70, 3615-3626.
- Macmillan KL, Taufa VK, Day AM, 1986: Effects of an agonist of gonadotropin releasing hormone (Buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim Reprod Sci*, 11, 1-10.
- Martin TL, Swanson LV, Appell LH, Rowe KE, Stormshak F, 1990: Response of the bovine corpus luteum to increased secretion of luteinizing hormone induced by exogenous gonadotropin releasing hormone. *Dom Anim Endocrinol*, 7, 27-34.
- Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ, 1999: Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Anim Reprod Sci*, 57, 23-33.
- Mee MO, Stevenson JS, Scoby RK, Folman Y, 1990: Influence of gonadotropin-releasing hormone and timing of insemination relative to estrus on pregnancy rates of dairy cattle at first service. *J Dairy Sci*, 73, 1500-1507.



- Peters AR, 2005: Veterinary clinical application of GnRH - questions of efficacy. *Anim Reprod Sci*, 88, 155-167.
- Phatak AP, Whitmore HL, Brown ND, 1986: Effect of gonadotropin releasing hormone on conception rate in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*, 26, 5, 605-609.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995: Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC, 1997: Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*, 80, 301-306.
- Rastegarnia A, Niasari-Naslaji A, Hovareshti P, Sarhaddi F, Safaei M, 2004: The effect of different doses of Gonadorelin on ovarian follicle dynamics in river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*, 62, 7, 1283-1291.
- Rodger LD, Stormshak F, 1986: Gonadotropin-releasing hormone-induced alteration of bovine corpus luteum function. *Biol Reprod*, 35, 149-156.
- Rosenberg M, Chun SY, Kaim M, Herz Z, Folman Y, 1991: The effect of GnRH administered to dairy cows during oestrus on plasma LH and conception in relation to the time of treatment and insemination. *Anim Reprod Sci*, 24, 13-24.
- Schneider F, Tomek W, Gründker C, 2006: Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its natural analogues: A review. *Theriogenology*, 66(4), 691-709.
- Srivastava SK, Kharche SD, 2002: Effect of GnRH on fertility in crossbred cows. *Indian J Anim Sci*, 72, 6, 428-430.
- Taponen J, Katila T, Rodríguez-Martínez H, 1999: Induction of ovulation with gonadotropin-releasing hormone during proestrus in cattle: influence on subsequent follicular growth and luteal function. *Anim Reprod Sci*, 55, 2, 91-105.
- Taponen J, 2003: Ovarian function in dairy cattle after gonadotropin-releasing hormone treatments during perioestrus. Academic Dissertation, University of Helsinki, Finland.
- Thatcher WW, Drost M, Savio JD, Macmillan KL, Entwistle KW, Schmitt EJ, de la Sota RL, Morris GR, 1993: New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. *Anim Reprod Sci*, 33, 27-49.
- Yamada K, Nakao T, Nakada K, Matsuda G, 2002: Influence of GnRH analogue (Fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci*, 74, 27-34.
- \*\* : Bu çalışma, aynı başlıklı Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.
- \*Yazışma Adresi:** Mustafa Kemal SARIBAY  
Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.  
e-mail: saribaymk@yahoo.com

## A Comparison of the Performance of Exfoliative Cytopathology, Polymerase Chain Reaction (PCR), Culture and ELISA in the Detection of *Brucella canis*

Nihat YUMUSAK<sup>1\*</sup>, Pelin Fatos POLAT<sup>2</sup>, Sevil ERDENLIG GURBILEK<sup>3</sup>, Cigdem CEBI SEN<sup>4</sup>,  
Rahsan YILMAZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Sanliurfa, Turkey.

<sup>2</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Sanliurfa, Turkey.

<sup>3</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Sanliurfa, Turkey.

<sup>4</sup>Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Sanliurfa, Turkey.

Received Date: 14.12.2016

Accepted Date: 08.02.2017

**Abstract:** This study was aimed to determine the performance of cytopathology for the diagnosis of *B. canis* on the basis of a comparison with culture, PCR and ELISA results. For this purpose, swabs for cytological, molecular and bacteriological examinations blood serum samples for serological tests were taken from 147 dogs which are suspected to have genital infection.. While the cytological samples were stained with May-Grünwald Giemsa solution, the swab samples were tested by bacteriologically and PCR and the serum samples were assayed by ELISA. According to the results, while ELISA yielded a seropositivity rate of 11.5%, PCR demonstrated a positivity rate of 1.8%. No *B. canis* could be isolated from the samples were taken for bacteriological examinations. At cytological examination, it was observed that the samples contained coccobacilli presented with abundant neutrophil leukocytes and macrophages. Some of these immune cells and epithelial cells were observed to contain round/oval shaped bacteria in their cytoplasm. The results of this study suggest that cytopathology can be used for auxiliary test for the diagnosis of brucellosis.

**Keywords:** *Brucella canis*, Cytopathology, PCR, ELISA.

### *Brucella canis*'in Tanısında Eksfoliyatif Sitopatoloji Verilerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), Kültür ve ELISA Yöntemleri ile Karşılaştırması

**Özet:** Bu çalışmada, *B. canis*'in tanısında sitopatolojik yöntemin kullanılabilirliğinin PCR, kültür ve ELISA yöntemleri ile belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla toplam 147 genital sistem enfeksiyonu şüphesi olan köpekten alınan sitolojik, swap ve kan serumu örnekleri incelendi. Sitolojik örnekler May Grünwald Giemsa boyaması yapılırken, mikrobiyolojik incelemeler amacıyla elde edilen swaplar bakteriyolojik kültür ve PCR ile test edildiler. Serum örnekleri ELISA ile test edildi. Yapılan çalışmalar sonucu ELISA yöntemiyle yapılan incelemelerde %11.5 oranında seropozitiflik, PCR yönteminde ise %1.8 oranında pozitiflik tespit edildi. Bakteriyolojik muayene için alınan örneklerde *B. canis* izole edilemedi. Sitolojik incelemelerde kokobasil ile beraber çok sayıda nötrofil lökosit ve makrofajla karşılaşıldı. Yer yer bu hücrelerin ve epitel hücrelerin sitoplazmasında yuvarlak-oval şekilli etkenlerle karşılaşıldı. Yapılan bu çalışmanın sonuçları sitopatolojinin brusellanın tanısında yardımcı bir test olarak kullanılabilirliğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** *Brusella canis*, Sitopatoloji, PCR, ELISA.

## Introduction

*B. canis* is a ubiquitous zoonotic bacterial pathogen, which causes abortion and infertility in dogs (Carmichael, 1990; Hollet, 2006). The very few studies conducted to date in humans and animals suggest a serological prevalence ranging between 7.45%-12.7% for infection with this pathogen (Diker et al., 1987; Kustritz, 2005; Oncel et al., 2005; Sayan et al., 2011). Brucellosis is diagnosed based on bacteriological, serological and molecular tests. To the authors' knowledge, to date, only one study has been conducted on the isolation of *B. canis* in Turkey. The definitive diagnosis of *B. canis* infection is made by either bacterial isolation from blood, vaginal secretion, foetal and placental tissues and

semen or by molecular techniques (Alton et al., 1988; Corbal et al., 1979). The polymerase chain reaction (PCR) is an ideal diagnostic alternative in that, when compared to bacterial isolation, it produces results within a shorter time period, does not require the use of viable bacteria and offers a practical and affordable option (Keid et al., 2007). Cytopathology has a wide area of use in the diagnosis of neoplasms, monitoring of tumour development, follow-up of tumour treatment, diagnosis of inflammatory lesions, bacterial identification and epidemiological research. However, cytopathological data yield more accurate results when complemented with other diagnostic

methods (Boon et al., 1982; Ghisleni et al., 2006; Watchel, 1964; Wellman, 1990).

This study was aimed at determining both the usability of cytopathology for the diagnosis of brucellosis and the accuracy of this method when supported with culture, ELISA and PCR results.

## Material and Methods

Cytological, bacteriological and serum samples taken between the years 2013 and 2016 from 147 sheltered dogs (42 males and 105 females) of different breed, sex and age, which were suspected of having genital infection due to the presence of clinical signs including genital discharge, metritis, posthitis and conception failure, constituted the material of the study. This study was conducted with the approval of the Local Ethics Committee of DOLVET-HADYEK (04.04.2014/2014-21). All procedures were carried out in compliance with the relevant national laws relating to the conduct of animal experimentation.

**Cytopathological Method:** Samples intended for cytopathological examination were taken for the application of exfoliative cytology technique. For this purpose, in the female animals, cell samples were collected by rolling sterile cotton swabs over the caudo-dorsal vaginal mucosa, such that contact with the vulva was avoided. In the male animals, the swabs were rolled over the preputial mucosa. The cotton tips of the swabs were gently placed on glass slides and rubbed over their surface so as to transfer the cells onto the slides. Subsequently, the smears were air-dried and stained with the May-Grünwald Giemsa method. Firstly, the smears were maintained in May-Grünwald solution for 5 minutes. Later, they were washed with distilled water for 30 seconds to remove the excess dye. For cytoplasmic staining, the smears were stained with Giemsa solution for 15 minutes. Then the smears were washed under tap water, air-dried and finally examined by light microscopy.

**Bacterial Isolation and Identification:** For the isolation of *B. canis*, the vaginal and preputial swabs taken from the dogs were cultured in tryptic soy broth, which contained serum (5-10%) and dextrose (1%) and was supplemented with amphotericin B (1 µg/ml) and vancomycin (20 µg/ml) for selectivity. These selective and enriched media were incubated at 37°C in an atmosphere of 5-10% (v-v) CO<sub>2</sub> for a period of 6 weeks. Each week they were sub-cultured onto solid media. For this purpose, Farrell's medium (Farrel, 1974) and a modified Thayer-Martin selective medium were used. Both media were prepared in accordance with the methods

described by the World Organisation for Animal Health (OIE) (OIE., 2009). Farrell's medium was supplemented with Brucella selective supplement (Oxoid, SR0083A) for selectivity. Samples that yielded no bacterial isolation at the end of the 6-week-period were considered to be negative.

**Bacterial Strains and Antigen Preparation:** In this study, the M-strain of *B. canis*, obtained from the culture collection of the microbiology laboratory, was used for antigen preparation. A loopful of the confirmed M-strain of *B. canis* was inoculated into slanted Sabouraud's dextrose agar (SDA) tubes and incubated at 37 °C for 48 hours. Antigen production was performed as described by Barrouin-Melo et al. (2007). Accordingly, non-viable cultures were filtered through sterile gauze and centrifuged at minimum 3500 xg for 10 minutes at a temperature below 10 °C. After the supernatant was discarded, the cells were suspended in PBS (pH 7.4) and centrifuged twice more as described before. The resulting final pellet was diluted with 10 ml of PBS and autoclaved at 120 °C under 1.5 atmosphere pressure for 20 minutes. Subsequently, the bacteria solutions transferred into sterile Eppendorf tubes were centrifuged at 12000 xg for 20 minutes at 4°C. The supernatant was harvested and dispensed in small volumes into sterile cryovial tubes so as to be stored at -20 °C to be later used as the ELISA solid-phase antigen.

**Positive and Negative Sera:** True positive and true negative sera were obtained from the OIE Brucella reference laboratory of the Animal and Plant Health Agency (APHA) in Britain.

**Indirect ELISA:** For the performance of the indirect ELISA method, a combination of previously conducted techniques was employed (Nielsen et al., 2007; Oliveira et al., 2011). The diluted ELISA solid-phase antigen, prepared at the optimum antigen concentration, and the antigen diluted in 0.05 M sodium carbonate (pH 9.6) antigen-coating buffer solution were distributed in a volume of 100 µl into each well of 96-well flat-bottom polystyrene microtiter plates (NUNC 692620). Subsequently, the antigen-coated plates were incubated at 4 °C for 18-24 hours and were later washed 5 times in PBS containing 0.05% Tween 20 (PBS/T). Next, the positive and negative sera, which were diluted at a proportion of 1/200 with PBS/T, were added twice for each serum sample, in a volume of 100 µl, into the wells of the plates. The plates were covered and incubated at room temperature for 1 hour. After the plates were washed for a further 5 times, a protein A/G conjugated with horseradish peroxidase (HRPO) was diluted with PBS/T at the

proportion indicated in the package insert and distributed into each well at a volume of 100 µl. After being incubated at room temperature for 1 hour, the plates were once again washed with PBS/T 5 times, and added 100 µl of chromogenic substrate (4.0 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1.0 mM 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt in 0.05 M citrate buffer pH 4.5). After the plates were maintained at room temperature for 10 to 15 minutes, they were added with 100 µl of 1mM sodium azide to slow down the reaction. Next, the absorbance values of the wells were determined at 450 nm using an automatic ELISA reader (VERSAmax 3.13/B2573). The threshold value was determined as the negative control mean plus 3 standard deviations (SD).

**Bacterial DNA Extraction and PCR:** For the extraction of *B. canis* DNA from the swab samples, a nucleic acid isolation robot (Kurabo, model Quick Gene 80) and a DNA isolation kit (QuickGene DNA tissue kit S) were used in accordance with the

manufacturer's instructions. The extracted DNA was stored at -20 °C until being used. The primers used for PCR and the target area are shown in Table 1. The amplification reaction mixture was prepared in a volume of 50 µl, which contained 200 µM of each dNTP, 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 1.5mM magnesium chloride, 0.5 µM of each primer, 1.25 U Taq polymerase (Fermentas) and 5 µl of template DNA. The amplification reaction was performed according to the steps described below and by using a Palm-Cycler (CG1-96) device. The PCR protocol was as follows: 1X2 min 95°C, 40X30 sec 95 °C, 40X30 sec 62 °C, 40X30 sec 72 °C and the final extension 1X5 min 72 °C. While *B. canis* RM6/66 reference DNA was used as a positive control, nuclease-free water was used as a negative control. After the PCR was performed, 10 µl of each amplicon were mixed with 1 µl of loading buffer and loaded into the 2% agarose gel wells. Next, the gel was stained with ethidium bromide (0.5 µg/mL) for the visualisation of the DNA bands under UV light.

**Table 1.** Primers used for the amplification of the target DNA

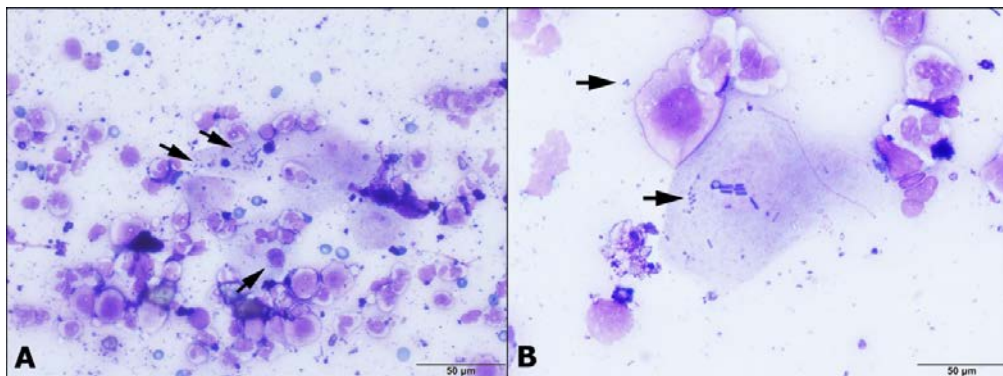
Primer	Sequence (5'-3')	Amplicon (bp)	DNA target
ITS66f	5'-ACATAGATCGCAGGCCAGTCA-3'	214	16S-23S rRNA
ITS279r	5' AGATACCGACGCAAACGCTAC-3'		interspace region

## Results

**Cytopathological Results:** Cytopathological examination demonstrated that the cases, confirmed to have been caused by *B. canis* by the use of molecular techniques, were characterized by dense neutrophil leukocyte infiltration and the presence of widely distributed macrophages. These cells were partly necrotic. Part of the neutrophil leukocytes, macrophages and epithelial cells contained many round-oval shaped bacteria in their cytoplasm. In these infected cells, the nucleus was observed to have been pushed aside, and moreover, some of

the nuclei were observed to have degenerated. Some of the preparations displayed a large number of neutrophil leukocytes together with the intracytoplasmic and extracellular presence of nonspecific bacteria of varying size and shape (Fig. 1A-B).

The other diagnostic methods employed in this study showed that these cases were negative for *B. canis*. It was determined that the female cases, which were confirmed to have bacterial infection, were in the oestrus phase of the sexual cycle. In some of the cases, free erythrocytes were also observed.



**Figure 1A-B.** Intracellular and extracellular, small and coccobacilli shape nonspecific bacteria (arrows), May-Grünwald Giemsa, (A), (B).

**Bacterial Isolation and Identification:** For isolation *B. canis*, the vaginal and preputial swabs taken from the dogs were inoculated into selective and enriched tryptic soy broth containing amphotericin B (1 µg/ml), vancomycin (20 µg/ml), serum (5-10%) and dextrose (1%). These selective and enriched media were incubated at 37 °C in an atmosphere of 5-10% (v-v) CO<sub>2</sub> for a period of 6 weeks. Each week, these cultures were subcultured onto Farrell's medium and a modified Thayer-Martin selective solid medium. However, *Brucella* spp. were not isolated within or at the end of this time period.

**Indirect ELISA:** In total, 157 serum samples were tested using a home-made ELISA, in which M-strain of *B. canis* was used as antigen. Thirteen of these serum samples produced a positive reaction. Thus, in result, 11.5% of the serum samples was found to be positive for *B. canis* (Fig. 2).



**Figure 2.** Home made ELISA results (each sample was tested duplicate).

**Bacterial DNA Isolation and PCR:** DNA was extracted from the swab samples and was used for the amplification of the 16S-23S rRNA interspace of *Brucella* spp. by PCR. Out of the 110 swab samples taken from the male and female animals, only 2 (1.8%) (the samples numbered 33 and 38) were found to be positive for *Brucella* spp (Fig. 3).



**Figure 3.** PCR results using DNAs from swabs.

## Discussion

Cytopathology has a wide range of use in the diagnosis of tumours, the selection of the appropriate treatment method for tumours on the basis of their character, the monitoring of the development of tumours and their post-treatment follow-up, the diagnosis of inflammatory lesions and causative agent identification in such cases, post-mortem examination and epidemiological research (Boon et al., 1982; Ghisleni et al., 2006; Watchel, 1964; Wellman, 1990). Despite its advantages, the cytopathological method is known to produce more accurate results when supported with other diagnostic methods. In the present study, the usability of cytopathology for the diagnosis of *B. canis* infection and the accuracy of this method was assessed on the basis of a comparative evaluation with PCR and ELISA techniques. The results of the present study demonstrated that the cytopathological findings were in agreement with the results of the other diagnostic methods used.

The presence of *B. canis* infection in Turkey has been documented with serological research. In 1983, serum samples taken from 134 healthy dogs in the Ankara province were tested by 2-mercaptoethanol added tube agglutination test (ME-TAT), which yielded a seropositivity rate of 6.7% (Istanbulluoglu and Diker., 1983). In 1987, employed the same test to 222 canine serum samples and obtained similar results (a seropositivity of 6.3%) (Diker et al., 1987). Most recently, in 2005, 362 serum samples collected in the izmir and İstanbul provinces were tested by TAT, ME-TAT and ELISA techniques, which produced seropositivity rates of 12.7%, 7.73% and 7.45%, respectively (Oncel et al., 2005). Nevertheless, research conducted in this particular area is scarce and there is not enough data to elucidate the current situation of canine brucellosis in Turkey. In the present study, which was carried out in the Şanlıurfa province, the seropositivity rate determined in the tested dogs was 11.5%, whilst the PCR results demonstrated a positivity rate of 1.8%. The results obtained in this study suggest that the prevalence of the disease in Turkey may be higher than the rates previously indicated in literature reports. Further regional studies would contribute to determining the true prevalence of the infection.

Canine brucellosis is generally diagnosed by bacteriological and serological tests. For this purpose, blood, vaginal secretion, foetal and placental tissues and semen are used to isolate the causative agent (Flores-Castro and Carmichael, 1978; Johnson and Walker., 1992; Moore and

Gupta, 1970). More than 50% of infected dogs remain bacteremic for at least 1 year. The isolation of the causative agent being burdensome and time-consuming and isolation not being able to be achieved in the very early and chronic phases of the disease have increased the importance of the serological diagnosis of canine brucellosis (Carmicheal, 1990; Hollett, 2006; Johnson and Walker, 1992). Nevertheless, despite the advancements achieved in diagnostic techniques, it is observed that the diagnostic process has lengthened. On the other hand, there is a need for the availability of more rapid and reliable tests that can be used on the field by veterinary practitioners for the diagnosis of infectious diseases. The results of the present study showed that cytopathology, of which the advantages have been described above, can be used for the early diagnosis of infectious diseases.

In the present study, among the animals included in the sampling frame, the seropositivity rate was determined to be 11.5%, whilst the PCR results demonstrated a positivity rate of 1.8%. To date, only very few studies have been conducted on the serological diagnosis of canine brucellosis in Turkey (Diker et al., 1987; İstanbulluoglu and Diker, 1983; Oncel et al., 2005). The results obtained in the present study do not fully agree with the results reported in previous research (Diker et al., 1987; Oncel et al., 2005), but show partial similarity. The positivity rate determined by ELISA in the present study is two-fold higher than the positivity rates previously reported for canine brucellosis. In study, no *B. canis* could be isolated. This might be attributed to the vaginal shedding of the agent being intermittent and at a level lower than the number of bacteria found in the aborted foetus and its membranes. Furthermore, serological tests are indirect tests and bear a high risk of producing cross reactions. Thus, high seropositivity rates may partly arise from such cross reactions.

Rapid cytological procedures, which are still being developed and require not much laboratory equipment to be employed, are gaining an increased importance in the diagnosis of diseases. In particular, the use of this method for the diagnosis of breast and cervix cancer in humans has enabled a decrease in the number of cases that would otherwise result in infertility and even death if they had remained undiagnosed. Although the data obtained in the present study is limited, the results obtained suggest that cytopathology could be used for the early diagnosis of canine brucellosis, which is an infectious genital disease of dogs. Different from our results, Madoz et al. (2014) reported that the cytological method proved to be inadequate for the diagnosis of bovine subclinical

endometritis. In their study, in which they compared the performance of the cytological and bacteriological methods in the diagnosis of tuberculous lymphadenitis, Abdista et al. (2014) reported that the cytological method offered a high sensitivity but low specificity. In another study, Powers (1998) indicated that the cytological method is not adequate for diagnosis when used alone and needs to be complemented with other diagnostic techniques.

In result, the data obtained in the present study demonstrated the usability of cytopathology as the auxillary test for diagnosis of *B. canis* infection in domestic animals. However, the number of material used, and thus, the data obtained in this study being limited requires the conduct of further more comprehensive studies. Furthermore, the present study showed that cytology fell short in the identification of nonspecific bacteria, which were detected in some of the cases investigated. This demonstrated that while cytology is highly sensitive, it is lowly specific. Therefore, results obtained with cytology should be complemented with clinical anamnesis data and the results of other diagnostic techniques. The results of the present study are expected to both provide data for veterinary practitioners and contribute to future cytopathological and bacteriological research in this field.

## Acknowledgment

This study was supported by Management of Scientific Research Projects of the Harran University (HUBAK) (Project number: 14167).

## References

- Abdissa K, Tadesse M, Bezabih M, Bekele A, Apers L, Rigouts L, Abebe G, 2014: Bacteriological methods as add on tests to fine-needle aspiration cytology in diagnosis of tuberculous lymphadenitis: can they reduce the diagnostic dilemma?. *BMC Infect Dis*, 31, 14,720.
- Alton, GG & Institut national agronomique Paris-Grignon, 1988: Techniques for the brucellosis laboratory. Institut Nacional de la Recherche Agronomique, Paris.
- Barouin-Melo SM, Poester FP, Riberio MB, Alcantara AC, Aguiar PHP, Nascimento IL, Schaer RE, Nascimento RM, Freire SM, 2007: Diagnosis of canine brucellosis by ELISA using an antigen obtained from wild *Brucella canis*. *Res Vet Sci*, 83, 340-346.
- Boon GD, Rebar AH, Denicola DB, 1982: A cytologic comparison of Romanowsky stains and Papanicolaou-type stains. I. Introduction, methodology and cytology of normal tissues. *Vet Clin Path*, 11, 22-30.

- Carmichael LE, 1990: *Brucella canis*. In: Animal brucellosis, Ed; Nielsen K, Duncan JR. Boca Raton: CRC Press; 335-350.
- Corbel MJ, Bracewell CD, Thomas EL, Gill KPW, 1979: Techniques in the identification of *Brucella* species. In: Identification Methods for Microbiologists, 2nd ed., Ed; Skinner FA & Lovelock DW, pp:86-89, Academic Press, London, UK and New York, USA.
- Corbel MJ, Hendry DMFD, 1983: Methods for the identification of *Brucella*. Booklet 2085. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Lion House, Alnwick, Northumberland, UK.
- Diker KS, Aydin N, Erdeger J, Ozyurt M, 1987: A serologic survey of dogs for *Brucella canis* and *Brucella abortus* and evaluation of mercapto ethanol microagglutination test. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 34, 268-277.
- Farrell ID, 1974: The development of new selective medium for the isolation of *Brucella abortus* from Contaminated Sources. *Res Vet Sci*, 16, 280-286.
- Flores-Castro R, Carmichael LE, 1978: Canine brucellosis. Current status of methods for diagnosis. *Cornell Vet*, 68, 76-88.
- Ghisleni G, Roccabianca P, Ceruti R, Stefanello D, Bertazzolo W, Bonfanti U, Caniatti M, 2006: Correlation between fine-needle aspiration cytology and histopathology in the evaluation of cutaneous and subcutaneous masses from dogs and cats. *Vet Clin Pathol*, 35, 1, 24-30.
- Hollett RB, 2006: Canine brucellosis: Outbreaks and compliance. *Theriogenology*, 66, 575-587.
- Istanbuluoglu E, Diker S, 1983: An serological analysis of *Brucella canis*. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 30, 14-18.
- Johnson CA, Walker RD, 1992: Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection. *The Comp Cont Educ*, 14, 763-772.
- Keid LB, Soares RM, Vasconcellos SA, Chiebao DP, Salgado VR, Megid J, Richtzenhain LJ, 2007: A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches. *Theriogenology*, 68, 1260-1270.
- Kustritz MVR, 2005: Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology*, 64, 755-765.
- Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, Sota RL, (2014): Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*, 97, 1-7.
- Moore JA, Gupta BN, 1970: Epizootiology, diagnosis, and control of *Brucella canis*. *J Am Vet Med Assoc*, 156, 1737-1740.
- Nielsen K, Smith P, Yu WL, Rojas X, Perez B, Conde S, Samartino L, Robles C, 2007: Detection of ovine antibody to *Brucella ovis* by indirect enzyme immunoassay. *J Immunoassay Immunoch*, 28, 243-250.
- OIE, 2009: Manual of Standards for Diagnostic tests and Vaccines. 3rd Edition, Caprine and ovine brucellosis chapter (2.7.2), Bovine Brucellosis chapter (2.4.3). Office International of Epizooties, Paris, France.
- Oliveira MZD, Vale V, Keid L, Freire SM, Meyer R, Portela RW, Barrouin-Melo SM, 2011: Validation of an ELISA method for the serological diagnosis of canine brucellosis due to *Brucella canis*. *Res Vet Sci*, 90, 425-431.
- Oncel T, Akan M, Sareyyupoglu B, Tel OY, Ciftci A, 2005: Seroprevalance of *Brucella canis* infection of dogs in two provinces in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 779-783.
- Power W, 1985: Cerebrospinal fluid lymphocytosis in acute bacterial meningitis. *Am J Med*, 79, 2, 216-220.
- Sayan M, Erdenlig S, Stack J, Kilic S, Guducuoglu H, Aksoy HY, Baklan EA, Etiler N, 2011: A serological Diagnostic Survey for *Brucella canis* infection in Turkish Patients with brucellosis-Like symptoms. *Jpn J Infect Dis*, 64, 516-519.
- Watchel EG, 1964: Exfoliative Cytology in Gynaecological Practice: Butterworth & Co.
- Wellman ML, 1990: The cytologic diagnosis of neoplasia. *Vet Clin North Am Small Anim Prac*, 20, 919-937.

**\*Corresponding Author:** Nihat YUMUSAK  
Harran University, Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Pathology, Sanliurfa, Turkey.  
e-mail: nihatyumusak@harran.edu.tr

## GAP Bölgesi'nde Pestisit Satış Yerlerinde Çalışanlarda Kolinesteraz İnhibitörleri ve Karaciğer Enzim Düzeylerinin İncelenmesi

Fatma MUTLU<sup>1\*</sup>, Zeynep ŞİMŞEK<sup>2</sup>, Mehmet Cici<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>3</sup>Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Çevre Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 17.12.2016

Kabul Tarihi: 27.12.2016

**Özet:** Pestisitler, zararlılara karşı kullanılan doğal veya sentetik kimyasal maddelerdir. Kimyasal pestisitler, nüfus artışına paralel olarak artan gıda ihtiyacını karşılamak için dünyanın her yerinde tarım zararlılarıyla mücadele için kullanımı hızla artan maddelerdir. Pestisitlerin bilinen etkilerinden biri karboksilik esteraz yapısındaki enzimleri inhibe etmeleridir. Bu enzimler, vücudun normal fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli olan asetilkolinin parçalanmasında rol alırlar. Asetilkolinesterazın inhibisyonu ise bütün kolinerjik sinaps ve kavşaklarda asetilkolin birikmesine neden olur. Böylece uzun dönemde pestisit etkilenimi, depresyon, hafıza bozukluğu, uyku bozukluğu, halsizlik, halüsinasyon görme gibi çeşitli rahatsızlıkları ortaya çıkarabilmektedir. Oldukça toksik kimyasal maddeler olan pestisitlerin kullanımındaki artış, toplumun etkilenme riskini de arttırmaktadır. Özellikle uygulamayı yapan kişilerin maruziyetleri üzerine yapılmış çalışmalar bulunmakla birlikte, satış yerlerinde çalışanlar üzerindeki sağlık etkilerine dair çalışmalar sınırlı düzeydedir. Pestisit satış yerlerinin artışına paralel olarak, uygulayan kişilerin yanı sıra bunların muhafazasını ve satışını yapan kişilerin de bu maddelerden etkilenim düzeylerini belirlemek önemlidir. Bu çalışmada, pestisit satışı yapılan yerlerde çalışanların etkileniş düzeylerini belirlemek amaçlanmıştır. GAP illerinin Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlükleri'nden temin edilen bayi listesinden örneklem seçimi yapılarak 399 kişiye soru formu uygulanmış ve 10 cc kan örneği alınmıştır. Kanlar santrifüj edildikten sonra, serumda bazı biyokimyasal parametrelere bakılmıştır. Pestisitlerin karaciğer fonksiyonlarına etkileri ile ilgili olarak elde edilen sonuçlar örnekleme yer alan işçilerin pestisitlerden olumsuz yönde etkilendiklerini göstermektedir. Pestisitlerle doğrudan temasta olan tarım ilacı satış bayilerinde çalışanlar, periyodik olarak kan testlerinden geçirilip kolinesteraz düzeyleri sürekli kontrol altında tutulmalı, normalin altındaki enzim düzeylerinde bir süre ortamdan uzak kalmaları sağlanmalı ve çalışma koşulları düzeltilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Karaciğer enzimleri, Kolinesteraz inhibitörleri, Pestisit, Tarım ilacı bayi.

### Investigation of Cholinesterase Inhibitors and Liver Enzyme Levels in Pesticide Dealer Workers of GAP Region

**Abstract:** Pesticides are natural or synthetic chemicals that are used for pest control. The use of chemical pesticides is increasing worldwide in parallel with the population growth and increasing food needs. One of the known effects of pesticides is the inhibition of enzymes in the composition of carboxylic esterase. These enzymes take role in decomposing the acetylcholine which is needed for sustaining normal body functions. The inhibition of acetylcholine causes its build up in all cholinergic synapses. Thus, pesticide influence may lead to depression, memory impairment, sleeping disorders, weakness, and hallucinations in the long term. The increase in use of pesticides which are quite toxic also raises the risk for public. Although there are studies on especially the exposure of practicing personnel, the studies of the health effects on personnel working in pesticide dealers are very limited. In parallel with the increase in number of pesticide dealers, it is important to investigate the exposure levels by these chemicals on workers that are responsible for the sale and storage of these materials. This study aims to determine the exposure levels of pesticide dealer workers. The list of dealers was obtained from the city directorates of GAP cities of Ministry of Food and Agriculture and used for selecting the 399 samples from whom 10 cc blood samples were taken. Some biochemical parameters were investigated after centrifuging the blood samples. The results show that there are effects on liver functions of workers included in the sample as a result of pesticide exposure. The workers who are in directly contact with pesticides should be periodically tested for cholinesterase levels and be continuously placed under control, the workers who have sub-normal enzyme levels should be removed from the work environment for a period and their working conditions should be recovered.

**Keywords:** Cholinesterase inhibitors, Liver enzymes, Pesticides, Pesticide dealer.

### Giriş

Tarım kimyasalları, besinleri, pestisitleri, petrol ürünlerini, gübrelere, bitki büyüme düzenleyicilerini ve veteriner ilaçlarını içeren pek çok formülden oluşur. Bu kimyasallar çeşitli formlarda (granül, toz

gibi küçük parçacıklar veya blok şeklinde katı olarak) kullanılır. Ayrıca aerosol, sıvı, gaz olarak da uygulanabilir (Ridgway ve ark., 1978). Pestisitler, zararlılara karşı kullanılan doğal veya sentetik



kimyasal maddelerdir. Kimyasal pestisitler, nüfus artışına paralel olarak artan gıda ihtiyacını karşılamak için dünyanın her yerinde tarım zararlılarıyla mücadele için kullanımı hızla artan maddelerdir. Pestisitlerin tarımdaki faydasının yanında, güvenli pestisit depolama ve uygulamaların yetersiz olduğu ülkelerde yabancı yaşam, toprak, su, çevre ve insan sağlığı üzerinde zararlı etkileri bildirilmiştir. Bu nedenle zararlılarla mücadelede en son tercih edilmesi gereken maddelerdir. Tarımda uygulanan pestisitlerin sadece %10'u hedeflenen organizmaya ulaşmakta, kalan miktarı ise su, toprak, hava ve çevreye yayılarak halk sağlığını etkilemekte ve hedef olmayan organizmalarda da zarara yol açmaktadır (Butinof ve ark., 2015).

Pestisitler, oldukça toksik kimyasal maddeler olup, bilinen etkilerinden biri karboksilikesteraz yapısındaki enzimleri inhibe etmeleridir. Asetil-kolinesteraz ve psedokolinesteraz sinir sisteminin sağlıklı çalışması için gerekli iki önemli enzimdir. Asetilkolin sinirler arasında ve sinirlerden kaslara iletimi sağlar. Asetilkolin salındıktan sonra temizlenmesi gerekir yoksa ileti devam eder bu işi asetil-kolinesteraz ve psedokolinesteraz yapar. Sinirler arasına sinyallerin düzgün iletilmesi için bu iki enzim gereklidir. Asetilkolinesteraz hem sinir hem de kırmızı kan hücrelerinde bulunurken, psedokolinesteraz ise sadece karaciğer hücrelerinde bulunur (Vural, 2005). Genellikle organik fosforlu bileşikler insektisit olarak kullanılmaktadır. Fosfor atomuna çifte bağ ile oksijen bağlanmışsa fosfatlar, sülfür bağlanmışsa tiyofosfatlar denir. Organik fosforlu bileşikler, toksisitelerini asetil kolinesteraz enzimini inhibe ederek gösterirler. Direkt etkili ve indirekt etkili olarak ikiye ayrılırlar. Direkt etkili P=O yapısında oldukları için aktivasyona gereksinimleri olmadan direkt kolinesterazı inhibe ederler. İndirekt etkili P=S ihtiva eden kimyasallardır. Bu sebeple tiyoester (P=S) bağı içeren ilaçların etki mekanizmaları P=O'ya dönüşümü ile aktivasyona uğrayarak asetilkolinesterazı inhibe etmeleri şeklinde olur. Asetilkolinesterazın inhibisyonu bütün kolinerjik sinaps ve kavşaklarda asetilkolin birikmesine neden olur. Uzun dönemde pestisit etkilenimi depresyon, hafıza bozukluğu, uyku bozukluğu, halsizlik, halüsinasyon görme gibi çeşitli rahatsızlıklar ortaya çıkarabilmektedir (Duydu, 2009). Pestisitlere uzun süre maruz kalan tarım işçilerinin karaciğer fonksiyonlarına bakılmış ve pestisitlere doğrudan maruziyeti olmayan kişilerle kıyaslandığında; bu kişilerde protein düzeyleri anlamlı bir şekilde azalırken, AST, ALT, ALP ve LDH değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Çömelekoğlu ve ark., 2000).

İçel'de yapılan bir çalışmada, tarım alanında çalışan kişilerin plazmalarında kolinesteraz enziminin aktivite değişimine bakılmış ve kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında kolinesteraz enzim düzeylerinde %24.71 oranında düşüş olduğu tespit edilmiştir (Zeren ve ark., 1998). Tunus'da yapılan bir çalışmada, tarımla uğraşan kişilerdeki biyokimyasal ve hematolojik bulguları üzerine pestisitlerin etkileri incelenmiş ve uzun dönemde pestisite maruziyetin, butiril-kolinesteraz enzimini inhibe ederek damar ve metabolik hastalıklarının gelişimine imkân sağladığı görülmüştür (Wafa ve ark., 2013). Dünya Sağlık Örgütü tarafından 1992 yılında yapılan bir araştırmaya göre her yıl dünyamızda 3 milyon zehirlenme olayının yaşandığı ve 220 000 ölümün gerçekleştiği ortaya konulmuştur (WHO, 1992). Gelecekteki 50 sene içinde yeryüzünde pestisit kullanımında azalma olmayacağı, bilakis artış olacağı öngörülmektedir. Sıcaklıkların artması sebebiyle ürün verimindeki azalmalardan dolayı elimizdeki ürün mevcudiyetini koruyabilmek için daha fazla pestisit kullanmamız gerekeceği tahmin edilmektedir (Miragly ve ark., 2009.).

Birçok pestisit, yararı yanında, insanlara, hayvan ve çevreye zararı dokunmaktadır. 1970'li yılların başından itibaren yapılmaya başlanılan çalışmaların sonucunda Kalıcı Organik Kirleticiler (KOK) diye isimlendirilen tarım ilaçları (aldrin, endrin, toksafen, klordan, dieldrin, heptakol, mireks, DDT, heksaklorobenzen ve pentaklorobenzen) bir takım durumlar haricinde kullanımdan kaldırılmış, ayrıca mevcut stoklar da izlenmeye alınmıştır (CFGİ, 2013). Antibiyotiklerde olduğu gibi pestisitler de gelişigüzel, kontrolsüz kullanılmaktadır (Demirdöğen, 2010). Pestisitler tek başına kullanıldığında zehirli olmasının yanısıra parçalanarak daha da zehirli yeni maddelerin oluşmasına sebebiyet vermektedirler (Tülüce ve ark., 2002). Pestisit satış yerlerinin artışına paralel olarak, uygulayan kişilerin yanı sıra bunların muhafazasını ve satışını yapan kişilerin de bu maddelerden etkilenim düzeylerini belirlemek önemlidir. Bu araştırmada, pestisit satışı yapılan yerlerde çalışanların etkilenimlerini belirlemek amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

GAP illerinin Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlükleri'nden tarım ilacı satan bayi listesi alınmış, örnek seçimi yapılarak 399 kişi ziyaret edilerek yüz yüze görüşme yöntemiyle yaş, cinsiyet, öğrenim durumu, çalışma süresi, sağlık yakınmalarından oluşan soru formu uygulanmış ve 10 cc kan alınmıştır. Serumlarda karaciğer hasarını belirlemek için sıklıkla kullanılan enzimlerden aminotranferazların [aspartat amino transferaz (AST-SGOT) ve alanin amino transferaz (ALT-SGPT)] düzeyi, asetilkolinesteraz (AChE) enzim düzeyi, alkalin fosfataz (ALP), total protein (T.Protein), albümin

(ALB) ve laktat dehidrojenaz (LDH) enzim düzeylerine spektrofotometrik metotla bakılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular standart değerlerle karşılaştırılarak enzim düzeyleri değerlendirilmiştir. Çalışanlara ait verilerden, SPSS 15.0 veri giriş ve analiz programında veri tabanı oluşturularak, anketlerin ve laboratuvar çalışmalarının sonuçları girilmiş ve biyoistatistiksel analizler yapılarak tablolar oluşturulmuştur. Bağımsız gruplarda oranların karşılaştırılmasında Pearson'un Ki-Kare testi uygulanmıştır.

## Bulgular

Çalışmaya katılan 399 kişinin %98.2'si erkek, %1.8'i kadın olup yaş gruplarına göre dağılımı, %4.3'ü 19 ve altında, %21.3'ü 20-29, %36.3'ü 30-39, %23.1'i 40-49 yaşları arasında olup, yaklaşık %14'ü 50 yaş ve üzerindedir (Tablo 1). Çalışmaya katılanların %10.3'ü ilkokula gitmemiş, %13.5'i ilkokul terk, %34.1'i ilkokul 1. kademe, %11.5'i ilkokul 2. kademe, %9.0'u lise mezunu, %20.8'i üniversite mezunudur. Bu kişilerin içinde en büyük grubu %44.9 oranıyla 1-9 yıl çalışanlar, sonraki büyük grubu da 1 yıldan az çalışanlar oluşturmaktadır. Tablo 2'de pestisit satış yerlerinde çalışanların bazı enzim düzeyleri çalışma sürelerine göre incelendiğinde; AST ortalama değeri istatistiksel olarak farklılık göstermemesine rağmen ( $P>0.05$ ) ALT, TPROT, ALB, LDH ve AChE değerleri istatistiksel olarak farklılık göstermektedir ( $P<0.05$ ). Tablo 3'te satış yerinde açıkta ürün bulunma durumuna göre enzim ortalama değerleri verilmiştir

ALT, ALP ve LDH değerleri açıkta ürün bulunma durumuna göre istatistiksel olarak farklılık gösterirken ( $P<0.05$ ), diğer enzimlerde istatistiksel farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). Tablo 4'te satış yerinde muhafazalı oda bulunma durumuna göre enzim ortalama değerleri verilmiştir. ALT ve ALB değerleri muhafazalı oda bulunma durumuna göre istatistiksel olarak farklılık gösterirken ( $P<0.05$ ), diğer enzimlerde istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). Tablo 5'de satış yerinde havalandırma düzeni bulunma durumuna göre enzim ortalama değerleri verilmiştir. ALT, TPROT, ALB ve LDH değerleri havalandırma düzeni bulunma durumuna göre istatistiksel farklılık gösterirken ( $P<0.05$ ), diğer enzimlerde istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ). Tablo 6'da satış yerlerinde çalışanların pestisit uygulamasında da çalışma durumuna göre, AST ve TPROT değerleri istatistiksel farklılık gösterirken ( $P<0.05$ ), diğer enzimlerde istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır ( $P>0.05$ ).

**Tablo 1.** Pestisit Satış Yerlerinde Çalışanların Yaş Gruplarına Göre Dağılımı

Yaş grupları, Yıl	Sayı	%
19 ve altı	17	4.3
20-29	85	21.3
30-39	145	36.3
40-49	92	23.1
50-59	36	9.0
60 ve üzeri	18	4.5
Cevapsız	6	1.5
<b>Toplam</b>	<b>399</b>	<b>100.0</b>

**Tablo 2.** Pestisit satış yerlerinde çalışanların çalışma sürelerine göre enzim düzeylerinin dağılımı

Çalışma Süresi	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
1 Yıldan az	17.4±8.9	13.8±8.4	78.5±36.6	7.3±0.7	4.2±0.4	274.4±226.2	9648.6±2280.1
1-9 Yıl	18.9±8.5	21.5±14.0	68.7±22.5	6.5±0.7	3.7±0.4	216.2±153.1	10046.4±2501.5
10 Yıl ve üzeri	19.7±9.0	27.6±16.9	66.6±14.0	6.4±0.5	3.5±0.4	176.7±34.4	10783.9±2540.9
F Değeri	1.795	28.950	6.226	58.563	88.965	7.648	4.475
P Değeri	0.167	0.0001	0.002	0.0001	0.0001	0.001	0.012

**Tablo 3.** Pestisit satış yerlerinde açıkta ürün satışı durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Açıkta Ürün Satılma Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	AChE
Evet	18.3±8.6	14.7±9.0	64.6±18.7	6.9±0.9	3.9±0.4	310.6±255.5	9354.8±2096.3
Hayır	18.3±9.3	19.3±14.0	6.9±0.8	3.9±0.4	3.9±0.5	231.4±181.7	10051.5±2458.5
T Değeri	-0.003	-2.241	-2.340	-0.363	-0.368	2.621	-1.865
P Değeri	0.997	0.026	0.020	0.717	0.713	0.009	0.063

**Tablo 4.** Pestisit satış yerlerinde muhafazalı oda olma durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Muhafazalı Oda Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	ACHe
Evet	18.3±9.6	17.9±12.9	71.3±22.9	6.9±0.8	4.0±0.5	247.9±200.8	9887.4±2447.7
Hayır	18.4±7.4	21.7±15.2	76.4±34.2	6.7±0.7	3.8±0.5	222.3±166.1	10212.9±2274.3
T Değeri	-0.083	-2.105	-1.487	1.797	2.061	0.996	-1.019
P Değeri	0.934	0.036	0.138	0.073	0.040	0.320	0.309

**Tablo 5.** Pestisit satış yerlerinde havalandırma düzeni bulunma durumuna göre dağılımı

Havalandırma Düzeni	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	ACHe
Evet	18.1±10.2	16.3±12.1	73.4±28.0	7.1±0.8	4.1±0.5	263.1±224.1	9791.5±2493.8
Hayır	18.7±7.7	21.9±14.6	71.6±23.1	6.7±0.7	3.8±0.5	214.6±143.6	10213±2308.6
T Değeri	-0.635	-3.775	0.609	4.973	6.085	2.233	-1.559
P Değeri	0.934	0.0001	0.543	0.001	0.0001	0.026	0.312

**Tablo 6.** Pestisit satış yerlerinde çalışanların pestisit uygulamasında çalışma durumuna göre enzim düzeylerinin dağılımı

Pestisit Uygulama Durumu	AST	ALT	ALP	TPROT	ALB	LDH	ACHe
Evet	20.1±12.2	13.7±7.9	69.8±25.4	7.5±0.7	4.2±0.5	338.0±299.9	9847.3±2326.6
Hayır	16.7±8.1	13.4±8.6	75.1±28.2	7.2±0.7	4.2±0.4	263.7±211.7	9329.9±2295.5
T Değeri	2.235	0.248	-1.215	2.388	0.617	1.947	1.411
P Değeri	0.027	0.804	0.226	0.018	0.538	0.053	0.160

## Tartışma ve Sonuç

Çalışmamız pestisit satılan yerde çalışan işçilerde çalışma süresi ile kolinesteraz seviyesinin azaldığını, karaciğer fonksiyon testlerinden AST'nin değişmediğini, ancak ALT'nin arttığını, ALP, TPROT, ALB ve LDH seviyelerinin azaldığını göstermiştir (Dökmeci ve Dökmeci, 2005). Her iki enzim de vücutta pek çok değişik dokuda bulunabilirken önemli kısımları karaciğerden salınır. ALT karaciğer hasarı için daha spesifik bir göstergesi olup (Sataloğlu ve ark., 2007) ALT'nin artması karaciğer hasarının olduğunu gösterir. TPROT ve ALB karaciğerin protein üretme kapasitesi ile ilgili fonksiyonlarını gösterir. Bu parametrelerdeki düşüş yine bir karaciğerin protein üretimine etki eden bir hasarın olduğunu gösterebilir (Eyer, 2003). ALB net olarak bilinmese de uzun süre pestisitlere maruziyetin TPROT seviyesinde azalmaya sebep olduğu bilinmektedir (Ghourri ve ark., 2010). LDH karaciğer ve karaciğer dışında bulunan ve karaciğer fonksiyon testi olarak kullanılan bir enzim olup, seviyesindeki düşme yine yapımı ile ilgili bir defekte işaret edebilir (Garg ve ark., 2004). Pek çok pestisit antioksidan defanstaki enzimlerin etkisini azalttığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda bazı pestisitlerin eritrositlerde AChE' ve antioksidan enzimleri azaltarak oksidasyonu arttırdığı gösterilmiştir (Santi ve ark., 2011). Kolinesteraz inhibisyonu, sinir sinapslarında ve nöromüsküler kavşaklarda ACh'nin artmasına yol açarak, ACh

reseptörlerinin aşırı uyarılmasına neden olur. AChE inhibisyonuna özellikle organik fosforlu pestisitler yol açar (Saydam ve ark., 2006). Ortaya çıkan klinik bulguların önemli bir kısmı sinaptik aralıkta aşırı ACh birikimi sonucunda ortaya çıkan nikotinik ve muskarinik aktivite artışıdır (Saritaş ve ark., 2007). Çalışmamızda pestisit satış yerlerinde çalışma süresi ile ACh artışı tespit edilmiştir; en belirgin olarak 9 yıldan fazla çalışan işçilerde görülmüştür. Pestisitlerin özel muhafazalar içinde satılması yerine açık olarak satılması hem buharlaşma ve hem de hava hareketlerinin etkisi ile ortam havasına geçmesine neden olabilir. Pestisitlerin olumsuz etkilerinden kaçınmak için satış yerlerinde muhafazalı bir oda bulundurulması önemlidir. Sürekli ortada duran bu maddelerin havaya karışma olasılığı artar. Pestisitlere solunumla maruziyet sonrasında bazı problemlere sebep olabilir (Güngördü ve ark., 2013). Bu maddeleri satan ve depolayan yerlerde havalandırma havada asılı kalan partiküllerin uzaklaştırması açısından gereklidir (Aktar ve ark., 2009). Pestisit zehirlenmeleri, kandaki kolinesteraz düzeyi ölçülerek ortaya çıkarılabilir. Solunum zorlukları, öksürük, burun akıntısı, göğüste daralma, gözde yanma ve sulanma, uykusuzluk, dikkat dağılması gibi belirtiler Normalin %20-25 altında olan enzim düzeylerinde meydana gelir (Akin ve ark., 1992).

Yurdumuzda pek çok pestisit satılırken bunların, insana zararsız olduğu iddia edilmektedir. Ancak bilimsel olarak bu kimyasalların hem insan hem de çevre üzerinde çok zararlı etkileri olduğu kanıtlanmıştır. Buna göre sadece bu sektörde çalışanlara değil topluma da gerekli eğitimler verilmeli ve insanlar pestisitler konusunda bilgilendirilmelidirler (Özay ve Arslantaş, 2016). Yapılan bir diğer çalışmada ilaçlama sektöründe çalışanlar ile zehirlenme ön tanısı ile gelen kişilerde erken tanı amacıyla kolinesteraz seviyesine bakmanın önemi vurgulanmıştır. İlaçlama sektöründe çalışanlarda düzenli aralıklarla kolinesteraz seviyesinin ölçümünün tanımlanmış merkezlerce yapılması, konunun ehemmiyeti açısından gereklidir. Ayrıca bu kişilerde kolinesteraz seviyesine bakılması ekonomi ve iş yükü bakımından büyük önem taşımaktadır. Aksi taktirde uzun süreli maruziyetlerde önlem alınmazsa ciddi sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Yücesan ve ark., 2013). ABD’de kolinesteraz inhibitörü olan pestisitleri uygulayan tarım işçilerinin, işverenleri tarafından özel sağlık sigortası yaptırılarak periyodik olarak enzim seviyelerinin ölçülmesi ve kayıtların 7 yıl boyunca saklanması yasal zorunluluk olarak yapılmaktadır. 30 günlük periyotlar içinde 30 saat veya daha fazla bu pestisitleri uygulayan işçilerin enzim seviyesine bakmak ve sonuçlarına göre gerekli önlemleri almak işverenin sorumluluğu altındadır (Furman ve ark., 2010).

Pestisitler soluduğumuz havayla aldığımız besinlerle ya da başka yollarla karşılaştığımız kimyasallardır. Bundan kaçınamadığımız göre en azından sağlığımızı korumak adına bu maddelerin insanların sağlığını tehdit etmeyecek miktarlarda olması gerekir. Bu da çeşitli önlemlerin alınması ve denetimlerinin düzenli yapılması şeklinde olur. Ülkemizde bu denetim mekanizmasının yetersiz olmasının yanı sıra mevcut mekanizma bile yeterince iyi çalıştırılmamaktadır (Yanıkoglu ve ark., 2001). Pestisit satış bayilerinde satış yapanların, yasa gereği ziraat mühendisi, eczacı, ziraat teknisyeni veya bitki sağlığı ile ilgili dersleri alarak mezun olmuş kişiler olması zorunluysen sadece %48-80’i bu koşulları sağlamaktadır. Satış yerlerinde hijyeni sağlamak için gerekli olan lavabo ve sabun, on işyerinden birinde mevcut bulunmamaktadır (Şimşek, 2016).

Tarım ilacı satış bayilerinde çalışanlar, çoğu zaman bilinçsizce yanlış işlemler yaparak kendi sağlıklarını ve toplum sağlığını tehlikeye atmaktadırlar. Bu kişilere periyodik olarak eğitimler verilmeli ve tarım ilaçları konusunda bilinçlendirilmelidirler. Bu bayiler de eczaneler gibi rutin denetimlere tabi tutulmalı; çalışma koşulları, satılan ürünler, iş yeri sağlığı ve güvenliği açısından incelenmelidir. Pestisitler de aynı ilaçlar gibi

kontrole tabi reçetelerle verilmelidir. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ile Sağlık Bakanlığı pestisitlerle alakalı yapılacak düzenlemelerde işbirliği yapmalı, pestisit üreten, satan bütün firmalar ve işyerleri denetlenmelidir (Babayiğit ve ark., 2014). Ülkemizde bütün pestisitleri kapsayacak şekilde, üretici firmaların teknik gelişmelere bağlı olarak Güvenlik Bilgi Formları (GBF)’ni hazırlaması, güncellemesi ve ilgili birimlere dağıtması zarureti yasal bir statüye kavuşturulmalıdır. Pestisitlerle doğrudan temasta olan tarım ilacı satış bayilerinde çalışanlar, periyodik olarak kan testlerinden geçirilip kolinesteraz düzeyleri sürekli kontrol altında tutulmalı, bu toksikolojik analizlerin belirli merkezlerde yapılması sağlanıp kayıtlar tutulmalı ve gerekli istatistikler yapılmalıdır. Bu sonuçlar izlenerek etkilenim sınırlarının aşılmış aşılmadığına bakılmalıdır. Normalin altındaki enzim düzeylerinde bir süre ortamdan uzak kalmaları sağlanmalı ve çalışma koşulları düzeltilmelidir. Pestisitler, kontrollü olarak depolanması, satılması ve kullanılması gereken kimyasallardır. Ayrıca pestisitlerin, çevreye ve halk sağlığına etkileri açısından bilimsel olarak incelemeler yapılmalı bunun yanı sıra bu inceleme ve araştırmalar da devlet tarafından desteklenmelidir.

## Teşekkür

Bu çalışma Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAK) tarafından desteklenmiştir (Proje No: 14057).

## Kaynaklar

- Akın G, Pekköz E, Gökhan H, 1992: Karaciğer. Tertip matbaası,90.
- Aktar W, Sengupta D, Chowdhury A, 2009: Impact of pesticides use in agriculture: Their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12.
- Babayiğit MA, Tekbaş OF, Çetin H, 2014: Zararlılarla Mücadelede Kullanılan Pestisitlerin Halk Sağlığına Etkileri ve Korumaya Yönelik Önlemler. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13, 5, 405-412.
- Butinof M, Fernandez RA, Stimolo MI, Lantieri MJ, Blanco M, Machado AL, Franchini G, Díaz MDP, 2015: Pesticide exposure and health conditions of terrestrial pesticide applicators in Córdoba Province, Argentina. *Cad Saude Pública*, 31, 3, 633.
- Center For Global Issues. Churchville, VA. <http://www.cfgi.org/> Erişim tarihi: 7 Aralık 2008.
- Çömelekoğlu Ü, Mazmanlı B, Arpacı A, 2000: Pestisitlerin kronik etkisine maruz kalan kalan Tarım İşçilerinde karaciğer fonksiyonlarının incelenmesi. *Türk J Biol*, 24, 461-466.
- Demirdöğen CB, 2010: Organofosfatlı pestisit zehirlenmeleri ve serum paraoksonaz1 (PON1) enziminin organofosfat metabolizmasındaki rolü. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 67, 2, 97-112.

- Dökmeci İ, Dökmeci AH, 2005: Toksikoloji zehirlenmelerde tanı ve tedavi. 4.baskı. Ankara: Nobel Matbaacılık, 582-607.
- Eyer P, 2003: The role of oximes in the management of organophosphorus pesticide poisoning. *Toxicol Rev*, 22, 3,165-90.
- Furman J, 2010: Cholinesterase Monitoring For Agricultural Pesticide Handlers. Guidelines for Health Care Providers in Washington State, U.S.A.
- Garg UK, Pal AK, Jha, GJ, Jadhao SB, 2004: Pathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides on bone health of broilerchicks. *Toxicol Pathol*, 32, 3, 364-9.
- Ghouri N, Preiss D, Sattar N, 2010: Liverenzymes, nonalcoholic fatty liver disease, and incident cardiovascular disease: an arrativer view and clinical perspective of prospective data. *Hepatology*, 52, 3, 1156-61.
- Güngördü A, Sireci N, Kücükbay H, Birhanli A, Ozmen, M, 2013: Evaluation of Invitro and invivo toxic effects of newly synthesized benzimidazole-based organophosphorus compounds. *Ecotoxicolgy and Environmental Safety*, 87, 23-32.
- Miraglia M, Marvin HJ, Kleter GA, Battilani P, Brera C, Coni E, Cubadda F, Croci L, De Santis B, Dekkers S, Filippi L, Hutjes RW, Noordam MY, Pisante M, Piva G, Prandini A, Toti L, Van den Born GJ, Vespermann A, 2009: Climate change and food safety: An emerging issue with special focus on Europe. *Food and Cheical Toxicology*, 47, 5, 1000-1021.
- Özay Ö, Arslantaş D, 2016: Pestisit Maruziyeti ve Nöropsikiyatrik Etkileri. *Osmangazi Tıp Dergisi*, 38(1), 42-48.
- Ridgway RL, Tinney JC, Macgregor JT, Slater NJ, 1978: Pesticide use in agriculture. *Environ Health Perspect*, 27, 103-112.
- Santi A, Menezes C, Duarte MM, Leitemperger J, Lopes T, Loro VL, 2011: Oxidative stres biomarkers and acetylcholine sterase activity in human erythrocytes exposed to clomazone (invitro). *Interdiscip Toxicol*, 4, 3,149-53.
- Sarıtaş A, Çakır Z, Aslan Ş, 2007: Organofosfat ve karbamat zehirlenmeleri. *The Eurasian J Med*, 3, 9,55-9.
- Sataloğlu N, Aydın B, Turla A, 2007: Pesticide Poisoning. *TAF Prev Med Bull*, 6, 3, 169-174.
- Saydam CK, Sözmén B, Aslan LS, 2006: Organofosfor zehirlenmelerine yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 26, 73-7.
- Şimşek Z, 2016: Tarım Sektöründe Çalışan Sağlığı ve Güvenliği Açısından Pestisit Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri, J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics*, 2, 64-68.
- Tülüce Y, Çelik İ, 2002: Influence of somecommercial pesticides on human erythrocyte carbonic anhydrase enzymes (invitro). *Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 12, 1, 27-29.
- Vural N, 2005: Toksikoloji, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, No:73, Ankara
- Wafa T, Nadia K, Amel N, Ikbal C, Insaf T, Asma K, Hedi MA, Mohamed H, 2013: Oxidativestress, hematological and biochemical alterations in farmers exposed to Pepticides. *J Environ Sci Health B*, 48, 12, 1058-1069.
- WHO, 1992: Our planet, our health: Report of the WHO commission on health and environment. Geneva: World Health Organization.
- Yanıkoğlu A, Kaya B, Şeker D, Gebizli H, 2001: Antalya örtüaltı tarımında pestisit kullanımı. *Standart*, 79.
- Yücesan B, Kurt M, Sezen F, Subaşı SA., 2013: İlaçlama sektöründe çalışan işçiler ile zehirlenme şüphesi görülen hastaların kolinesteraz seviyelerinin belirlenmesi. *Türk Hijyen Deneysel Biyoloji Dergisi*, 70, 1, 7-14.
- Zeren O, Dikmen N, Kumbur H, Taga S, 1998: İçel ilinde tarımsal kesimde çalışan kişilerin plazmalarında kolinesteraz aktivite değişiminin araştırılması. *Türk Entomol Derg*, 22, 3, 199-205.

**\*Yazışma Adresi:** Fatma MUTLU

Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü,  
Şanlıurfa, Türkiye.

e-mail: bilgesu06@mynet.com

## Aydın ve İzmir İllerindeki Koyun ve Keçilerde Pestivirus Enfeksiyonunun Serolojik ve Virolojik Olarak Araştırılması

Zafer Emin URAL, Nural EROL\*

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.

Geliş Tarihi: 10.01.2017

Kabul Tarihi: 23.02.2017

**Özet:** Bu çalışma ile Aydın ve İzmir illerindeki koyun ve keçilerde pestivirus enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada 128 adet keçi, 332 adet koyun olmak üzere toplam 460 adet hayvandan serum örnekleri elde edildi. Alınan kan serumu örneklerinde, bovine viral diarrhoea virusunun (BVDV) referans suşu NADL kullanılarak virus nötralizasyon testi ile antikor varlığı araştırıldı. Toplam 348 adet (116 adet keçi, 232 adet koyun) hayvandan alınan tam kan örnekleri pestivirus spesifik antijen varlığı yönünden ticari Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Serelisa® BVD p80Ag Mono Indirect, Synbiotics, Europe, Lyon, France) ile test edildi. Keçi örneklerinin %41.40'ının (53 /128), koyun örneklerinin ise %47.59'unun (158/332) seropozitif olduğu saptandı. Seropozitif bulunan toplam 211 serum örneğinin %37.44'ünde 1/5, %34.12'sinde 1/10, %14.21'inde 1/20, %5.21'inde 1/40, %5.68'inde 1/80 ve %3.31'inde ise 1/160 olarak SN<sub>50</sub> değerleri belirlendi. Test edilen tam kan örneklerinin antijen yönünden negatif olduğu belirlendi. Bu çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde örneklenen koyun ve keçilerde viremik hayvan tespit edilmemiş olmasına rağmen, %45.87 (211/460) oranında seropozitiflik saptanması pestivirusların bölgede sirküle olduğunu ve önemli ekonomik kayıplara neden olabileceğini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antijen, Antikor, Keçi, Koyun, Pestivirus.

### A Serological and Virological Investigation of the Pestivirus Infections in Sheep and Goats in the Aydın and Izmir Provinces

**Abstract:** The objective of this study was serological and virological investigation of pestivirus infections in sheep and goats in the Aydın and Izmir provinces. In the study, 460 serum samples were collected from 128 goats and 332 sheep. The presence of antibodies in the blood serum samples was investigated using NADL, the reference strain for bovine viral diarrhoea virus (BVDV) in virus neutralization test. In total, 348 whole blood samples collected from 116 goats and 232 sheep were tested for the presence of the pestivirus specific antigens using commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Serelisa® BVD p80ag Mono Indirect, Synbiotics, Europe, Lyon, France). 41.40% (53/128) of the goat and 47.59% (158/332) of the sheep samples were found to be seropositive. SN<sub>50</sub> values were 1/5 in 37.44%, 1/10 in 34.12%, 1/20 in 14.21%, 1/40 in 5.21%, 1/80 in 5.68% and 1/160 in 3.31% of the 211 seropositive serum samples. The whole blood samples tested were negative for the antigen. Although no viremia was detected in any of the sheep and goat tested in this study, the 45.87% (211/460) rate of seropositivity shows that Pestiviruses may be circulating in the region and may cause significant economic losses.

**Keywords:** Pestivirus, Antigen, Antibody, Goat, Sheep.

### Giriş

Border disease virusunu (BDV) içine alan *Pestivirus* genusu, *Flaviviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. *Pestivirus* genusu içerisinde genel olarak BDV, bovine viral diarrhoea virusu (BVDV) genotip 1, BVDV genotip 2 ve klasik domuz vebası virusu (KDVV) olmak üzere dört virus bulunmaktadır. Bu viruslar birbirleriyle antijenik ve genetik olarak yakın akrabadırlar (Lindenbach ve ark., 2000). Ancak, BVDV ve BDV izolatlarının antijenik, fiziksel ve biyolojik olarak birbirlerine yakınlıkları daha fazladır. Virusların her biri enfeksiyona sebep oldukları hayvan türünün yanı sıra sığır, koyun, keçi ve domuzlarda doğal ve deneysel enfeksiyonlara sebep olmaktadır (Burgu ve ark., 1987; Carlsson, 1991; Van Oirschot, 1983). Saha çalışmaları ve deneysel çalışmalar, BVDV'nin

sığırlarda, BDV'nin ise koyunlarda benzer klinik ve patolojik tablolar ile seyreden enfeksiyonlar geliştirdiğini göstermiştir (Carlsson ve Belak, 1994; Van Oirschot, 1983). Erişkin koyun ve keçilerde akut pestivirus enfeksiyonlarında genel olarak hafif ateş dışında klinik bulguya rastlanmaz. Ancak gebe hayvanlarda plasenta bariyerini aşan etken fetusta gebeliğin dönemlerine göre farklı sonuçlara yol açar (Sawyer ve ark., 1991). Abort, prematüre doğum, zayıf yavru ya da doğumu takiben ölen yavrular görülebilir. Kuzularda şiddetli tremor, arka ayaklar ve sırt kaslarında ritmik kontraksiyon, baş, kuyruk ve kulaklarda titreme gibi sinir sistemi bulgularına rastlanır. Özellikle sırt ve boyun bölgesindeki yapağı köpek kılı görünümünde, karışık ve dayanıklılığını kaybetmiştir (Hairy Shaker Disease). Özellikle ko-

yunlarda fetal enfeksiyonu takiben, yaşamları boyunca virüsü devamlı saçan persiste enfekte (PE) yavru doğumları oluşabilmektedir (Sawyer ve ark., 1991). Hastalığın yayılmasında PE hayvanların önemi büyüktür. Bu nedenle enfeksiyonun epidemiyolojisinde intrauterin bulaşma oldukça önemli bir rol oynamaktadır.

Türkiye’de pestivirusların varlığı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (Burgu ve ark., 1984; 1987; 2001; Burgu ve Özkul, 1993; Tan ve ark., 2006). Ülkemizdeki küçük ruminantlarda pestivirusların ekonomik kayıplara yol açtığı ve abort olaylarında rol oynadığı bildirilmiştir. Örneklenen küçük ruminant sürülerinde %0.06-3 arasında değişen oranlarda etken varlığı tespit edilmiştir (Burgu ve ark., 1984; 1987; 2001). Abort olaylarında yapılan araştırmalarda da %0.7 ile %100 arasında değişen oranlarda pestivirus enfeksiyonu bildirilmiştir (Albayrak ve Özan, 2012; Burgu, 1987; Hasircioğlu ve ark., 2009). Hayvanların sağlıklı olarak yetiştirilebilmesi ve en yüksek verimin elde edilebilmesi için, enfeksiyöz hastalıklardan koruma önemli bir rol oynamaktadır. Bu amaçla, viral hastalıkların tanısının yapılması ve epidemiyolojik durumlarının araştırılması mücadele yöntemlerinin belirlenmesi ve geliştirilmesi için önemli bir kriterdir.

Bu çalışmada Aydın ve İzmir illerindeki koyun ve keçi yetiştiriciliği yapan işletmelerde BDV enfeksiyonunun serolojik ve virolojik olarak varlığı ve yaygınlık oranı araştırılmıştır. Çalışmada virus antijeni taraması yapılarak enfeksiyonun epizootiyolojisinde oldukça önemi olan ve devamlı virus saçan persiste enfekte hayvanların tespit edilmesi ve görülme sıklığının saptanması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

**Örneklenen Hayvanlar:** Bu çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde bulunan özel sektöre ait sürü kapasiteleri 20 ile 600 arasında değişen 47 adet işletmede bulunan koyun ve keçide BDV enfeksiyonunun varlığı araştırıldı. İzmir ilinden 250, Aydın ilinden ise 210 adet olmak üzere toplam 460 adet hayvan örneklendi. Her iki ilde 128 adet keçiden ve 332 adet koyundan kan örneği alındı. Örnekleme esnasında hayvanların ait oldukları işletme, hayvan türü, kulak numarası, cinsiyet, ırk, yaş, sağlık durumu vb. bilgiler kaydedildi. Kan örnekleri 10’ar ml kaolinli ve EDTA’lı vakumlu tüplere vena jugularisten alındı. Kaolin içeren, tüplere alınmış olan kan örnekleri 3000 g’de 10 dk. santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve 56 °C’de 30 dk. tutularak inaktive edildi. Serum örnekleri -20 °C’de saklandı. Tam kan örnekleri ise kan toplanmasını takiben dondurulmadan antijen yönünden test edildi.

**Hücre Kültürü:** Virus Nötralizasyon testi, Serum Nötralizasyon<sub>50</sub> (SN<sub>50</sub>) değerinin hesaplanması, BVDV virusunun üretilmesi ve enfeksiyözite gücünün hesaplanması için Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) (ATCC, CCL-22) hücre kültürü kullanıldı.

**Virus:** Pestivirusa karşı oluşan antikorların tespiti için BVDV virusunun referans suşu olan “NADL” kullanıldı.

**Virus Nötralizasyon Testi ve Serum Nötralizasyon<sub>50</sub> (SN<sub>50</sub>) Testi:** Elde edilen 460 adet serum örneğinde pestivirus spesifik nötralizan antikor varlığının tespiti için Frey ve Liess’in (1971) bildirdikleri yöntemden yararlanılarak, virus nötralizasyon testi (VNT) uygulandı. Pestivirus yönünden seropozitif olduğu saptanan kan serumlarının antikor titrelerinin belirlenmesi için, 96 gözlü pleyt üzerine iki sıra halinde 1/5, 1/10, 1/20,...1/160 oranlarında serum sulandırmaları hazırlanarak, Serum Nötralizasyon<sub>50</sub> (SN<sub>50</sub>) değerleri hesaplandı. BVDV için serum numunelerinin 96 gözlü pleyt üzerine iki sıra halinde vasat ile 1/5, 1/10, 1/20,...1/160 oranlarında serum sulandırmaları hazırlandı.

**Pestivirus antijenlerinin tespiti:** Toplam 348 adet (116 adet keçi, 232 adet koyun) hayvandan alınan tam kan örnekleri pestivirus spesifik antijen varlığı yönünden ticari Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) (Serelisa® BVD p80Ag Mono Indirect, Synbiotics, Europe, Lyon, France) ile test edildi. Test pan-pestivirus spesifik proteini (p80) akut, kronik ve persiste viremik hayvanlarda saptayabilmektedir. Test üretici firmanın önerdiği prosedüre göre uygulandı.

**İstatistiksel Değerlendirme:** Aydın ve İzmir illerindeki keçi ve koyunlarda tür, coğrafik konum, yaş ve cinsiyete göre seropozitiflik oranlarının istatistiksel karşılaştırılmaları  $\chi^2$  testi (Steel ve Torrie, 1980) ile SPSS programı kullanılarak yapıldı.

## Bulgular

**Virolojik Araştırma Bulguları:** Viremik hayvanların tespiti amacıyla test edilen toplam 348 adet hayvanın (116 adet keçi ve 232 adet koyun) tamamı indirek Ag-C-ELISA ile antijen yönünden negatif olduğu belirlendi.

**Serolojik Araştırma Bulguları:** Tablo 1’de iller bazında koyun ve keçilerde pestivirusa karşı antikor pozitif hayvan sayıları ve yaygınlık oranları belirtilmiştir. Çalışmada toplam 460 adet hayvandan 212 adedinin (%46.09) seropozitif olduğu tespit edildi. Genel olarak pestivirus’a karşı antikor pozitiflik oranı Aydın ve İzmir yöresinde yetiştirilen

keçilerde %42.97 (55/128), koyunlarda ise %47.29 (157/332) olarak saptandı. Türlerin seropozitiflik

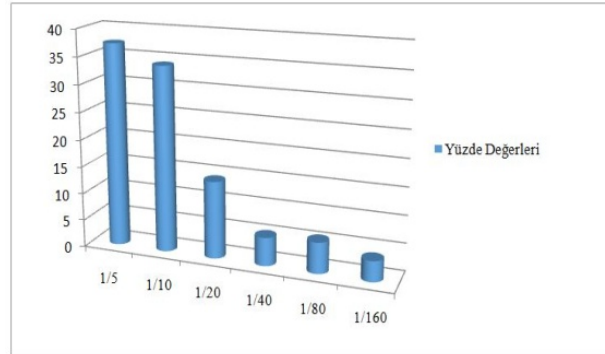
oranları arasındaki istatistiksel farklılık önemli bulunmadı (0.46;  $P>0.05$ ).

**Tablo 1.** İllere ve hayvan türlerine göre pestivirus seropozitiflik yaygınlığı

	KEÇİ			KOYUN			TOPLAM		
	n	Seropozitif	%	n	Seropozitif	%	n	Seropozitif	%
Aydın	89	41	46.07	121	61	50.41	210	102	48.57
İzmir	39	14	35.90	211	96	45.50	250	110	44
<b>Genel Toplam</b>	<b>128</b>	<b>55</b>	<b>42.97</b>	<b>332</b>	<b>157</b>	<b>47.29</b>	<b>460</b>	<b>212</b>	<b>46.09</b>

Aydın'da bulunan 121 koyundan 61 tanesi (%50.41) ve İzmir'den örneklenen 211 koyundan 96 tanesi (%45.50) seropozitif bulundu. İzmir'de bulunan 39 adet keçiden 14 adedinde (%35.90) seropozitiflik saptandı. Aydın'dan örneklenen 89 adet keçiden 41 adedinin (%46.07) seropozitif olduğu görüldü. İller bazında keçilerdeki ve koyunlardaki seropozitiflik oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (Keçi 0.26, Koyun 0.42;  $P>0.05$ ). Hayvanlardaki seropozitiflik oranları yaş bazında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı (0.32;  $P>0.05$ ). Hayvanların cinsiyetlerine göre seropozitiflik oranları değerlendirildiğinde erkek keçilerin %30.77'si (8/26), dişi keçilerin ise %46.08'i

(47/102) antikor pozitif olarak saptandı. Keçilerin cinsiyetlerine göre erkek ve dişi hayvanların seropozitiflik oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (0.14;  $P>0.05$ ). Koyunların cinsiyetlerine göre yapılan istatistiksel analizde ise erkek ve dişi hayvanların seropozitiflik oranları arasındaki farklılığın anlamlı olduğu gözlemlendi (0.002;  $P<0.05$ ). Koçlarda %18.52 (5/27) ve dişi koyunlarda %49.84'ü (152/305) oranında seropozitiflik saptandı. Seropozitif bulunan toplam 212 serum örneğinin %37.26'sında 1/5, %34.26'sında 1/10, %14.15'inde 1/20, %5.18'inde 1/40, %5.66'sında 1/80 ve %3.77'sinde ise 1/160 olarak  $SN_{50}$  değerleri belirlendi (Şekil 1).



**Şekil 1.** Seropozitif hayvanlarda antikor titre dağılımları

## Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde bulunan toplam 460 adet hayvana ait kan serumu örneğinde pestiviruslara karşı oluşan antikor varlığı virus nötralizasyon testi kullanılarak araştırılmıştır. Test sonucuna göre serum örneklerinin 212 adedinde (%46.09) seropozitiflik saptanmıştır. Bölgedeki keçilerde yaygınlık oranı genel olarak %42.97 (55/128), koyunlarda ise %47.29 (157/332) olduğu görülmüştür. Pestivirus antijen varlığının belirlenmesi için direkt ELISA kullanılarak test edilen örneklerinin (n=348) tümünün negatif olduğu belirlendi. BDV ve BVD virusları antijenik olarak çok yakın akraba olmaları ve serolojik testlerde çapraz reaksiyon vermeleri dolayısıyla genel olarak pestivirus enfeksiyonu adı altında teşhis edilebil-

mektedirler. Pestivirusların tür bariyerini aşabilmeleri nedeniyle koyun ve sığırlarda hem BDV'nin hem de BVDV'nin yüksek oranda enfeksiyon oluşturabildiği bilinmektedir (Julia ve ark., 2009; Mishra ve ark., 2012). Bu çalışmada NADL suşu kullanılarak BVDV antikorlarının tespit edilmesi ile tüm pestiviruslara karşı oluşan antikor varlığını göstermek mümkün olmuştur. Ancak BDV suşu kullanarak bölgedeki koyun ve keçilerde spesifik olarak BDV enfeksiyonunun da varlığını ve yaygınlığını ortaya koymakta fayda olduğu düşünülmektedir.

Dünya'da ve Türkiye'de pestivirus enfeksiyonlarının küçük ruminantlarda varlığı ve yaygınlığı serolojik veya virolojik olarak yapılan birçok çalışma ile rapor edilmiştir. Koyunlarda pestivirusa karşı



oluşan seropozitifliğin Avusturalya'da %29.4 (Krametter-Froetscher, 2010), Kanada'da %10.9 (Lamontagne ve Roy, 1984), Norveç'te %4.5 (Löken ve ark., 1991), İrlanda'da %5.6 (O'Neill 2004) ve İsviçre'de %67 (Schaller 2000), olduğu bildirilmiştir. Türkiye'deki koyunlarda yapılan çalışmalarda ise seropozitiflik oranları Konya ilinde %79 (Avcı, 2010), Kırıkkale'de %74.51 (Azkur ve ark., 2011), Samsun ilinde %90.27 (Ozan ve ark., 2012), Burdur bölgesinde %64.6 (Hasırcıoğlu ve ark., 2009), Sinop'ta %1.04, Amasya'da %2.30, Samsun'da %3, Trabzonda %4.76, Giresun'da %15.43, Sivas'ta %18.08, Kayseri'de %32.26, Tokat'ta %50.74, Erzurum'da %52.3 olarak saptanmış olup, Ordu ve Rize'de pestiviruslara karşı herhangi bir antikor varlığı tespit edilmemiştir (Okur-Gümüsova ve ark., 2006). Gür ve ark. (2009) keçi sürülerinde yaptıkları bir çalışmada Afyon ve çevresinde %61.8, Konya'da %63.9, Eskişehir'de %78.8 oranında seropozitiflik bildirmişlerdir. Ataseven ve ark. (2006), Doğu ve Güneydoğu Anadolu'daki keçi sürülerinde BDV ye karşı %63.6, BVDV ye karşı ise % 30.2 seropozitiflik tespit etmişlerdir. Yazıcı ve ark. (2012) Orta ve Doğu Karadeniz bölgelerindeki koyunlarda SNT ile %4.81 ile %67.76 oranında seropozitiflik bulmuşlardır. Bu çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde bulunan toplam 460 hayvandan alınan serum örneklerinin 212 adedinde (%46.09) seropozitiflik saptandı. Bölgedeki keçilerde yaygınlık oranı genel olarak %42.97 (55/128), koyunlarda ise %47.29 (157/332) olduğu görüldü. İllere göre yaygınlık oranlarına bakıldığında Aydın'da bulunan koyunların %50.41'i (61/121) seropozitif olarak saptanırken, İzmir ilinden örneklenen koyunların %45.50'si (96/211) seropozitif bulundu. İzmir'de bulunan keçilerin %35.90'unda (14/39) seropozitiflik saptandı. Aydın'dan örneklenen keçilerin %46.07'sinin (41/89 adet) seropozitif olduğu görüldü. İller bazında keçilerdeki ve koyunlardaki seropozitiflik oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı. Her iki ildeki koyun ve keçilerde seropozitiflik oranlarının istatistiksel olarak yakın olduğu gözlemlendi. Çalışmada elde edilen seropozitiflik oranları, Türkiye'nin birçok yöresinde yapılan epizootiyolojik çalışmaların (Ataseven ve ark., 2006; Azkur ve ark., 2011; Gür ve ark, 2009) verilerinden daha düşük olsa da, bölgede pestivirus enfeksiyonlarının yaygın olduğunu göstermektedir. Ayrıca enfeksiyonun görülme sıklığı bakımından istatistiki olarak konakçı türü farklılığının bulunmadığı ve her iki türde de yaygın olarak bulunduğu gözlenmiştir. Bu bağlamda bölgede pestivirus nedenli ekonomik kayıpların olabileceği göz ardı edilmemelidir. Enfeksiyonun sahadaki sirkülasyonu akut ve persiste enfekte hayvanlar tarafından sağlanmaktadır. Persiste enfekte hayvanların sayısı genellikle düşük olmasına rağmen sürü

inde virusun asıl devamlılığını sağlamaktadır. Dolayısıyla sürüdeki tüm hayvanların periyodik aralıklarla virolojik yönden kontrol edilmesi, yeni doğanların persiste enfekte olup olmadığının belirlenmesi önerilebilir. Ayrıca, yeni getirilen virus negatif hayvanların problemlili sürülerden ayrı tutulması, aynı şekilde virustan ari hale getirilmiş sürülere yeni hayvanların virolojik olarak kontrol edildikten sonra katılması büyük önem taşımaktadır.

Bu çalışmada viremik hayvan saptanmamıştır. Dolayısıyla virusa yönelik çalışmalar da yapılamamıştır. Daha önce yapılan saha çalışmalarında etken varlığı %0.06 ile 3 arasında tespit edilmiştir (Burgu ve ark., 1984; 1987; 2001; Gür, 2009; Oğuzoğlu ve ark., 2009). Ancak son yıllarda ülkemizde klinik ve patolojik olarak pestivirus şüpheli vakaların arttığı kaydedilmiş, abort vakalarında yapılan virolojik çalışmaların sonuçları bu şüpheleri doğrulamıştır (Albayrak ve Ozan, 2012; Hasırcıoğlu ve ark., 2009, Ozan ve ark., 2012; İssi ve ark., 2012). Gelecek çalışmalarda, tespit edilen pozitif klinik olgularda izole edilecek virusların genomik kimliklendirilmesinde yarar görülmektedir. Viral enfeksiyonlara karşı başarılı mücadele programlarının oluşturulabilmesi için virusların moleküler, epizootiyolojik, klinik ve patogenetik karakterizasyonlarının ayrıntılı şekilde yapılması gerekmektedir. Elde edilecek sonuçların pestiviruslara karşı mücadele ve kontrol programlarının hazırlanmasına ışık tutacağı açıktır.

Klinik bulgular ve ayrıntılı laboratuvar analizlerinde geniş çaplı border disease salgını Türkiye'de bildirilmemesine rağmen yapılan epizootiyolojik çalışmalar, Türkiye'nin bazı bölgelerindeki koyun sürülerinde nispeten daha yaygın olduğu ve görünüşte sağlıklı olan hayvanlarda persiste enfeksiyon olabileceğini göstermektedir (Ural ve ark., 2011). Ancak çalışmamızda yüksek antikor pozitiflik oranı saptanmış olup, viremik hayvana rastlanılamamıştır. Bu durum örneklenen sürülerde persiste viremik hayvanların az olduğunu düşündürmektedir. Persiste enfeksiyon çoğunlukla sığırlarda görülmektedir. Keçilerde doğal şartlarda persiste enfeksiyon koyunlara nazaran daha nadir olduğu bildirilmiştir. Ancak BVDV ile yapılan deneysel çalışmalar persiste enfeksiyonun keçilerde de görülebileceğini göstermektedir (Pressler ve ark., 2014). Bu durum gerek koyun, gerekse keçilerde yapılacak surveyans çalışmalarında göz ardı edilmemelidir. Bu tür viremik hayvanların düşük oranda bulunması dahi, ciddi bir enfeksiyon kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu bağlamda viremik hayvanların tarama sırasında tespit edilmesinin zor olduğu ve bu durumun enfeksiyonla mücadeleyi güçleştiren faktörlerden olduğu söylenilebilir. Bu nedenle sürüdeki tüm hayvanların virolojik yönden incelenmesi ve virus pozitif hayvanların sürüden uzaklaştırılması gerekliliği vurgulanmalıdır.

Pestivirus yönünden seropozitif olduğu tespit edilen toplam 212 hayvanın 79 adedinde (%37.26) 1/5 oranında, 72 adedinde (%33.96) 1/10 oranında, 30 adedinde (%14.15) 1/20 oranında, 11 adedinde (%5.18) 1/40 oranında, 12 adedinde (%5.66) 1/80 oranında ve 8 adedinde (%3.77) ise 1/160 oranında SN<sub>50</sub> değeri (antikor titresi) saptandı. Sürülerde yüksek titrede antikora sahip hayvanların bulunması yakın zamanda akut enfeksiyonun meydana geldiğini işaret etmektedir.

Koyunlar ve keçiler ayrı olarak incelendiğinde her yaşta ortalama aynı oranda seropozitiflik belirlenmiştir. Azkur ve ark. (2011) tarafından, cinsiyet ve yaşa göre seropozitiflik oranları arasında bir bağlantı saptanmazken, koyun ırkları ve pestivirusa karşı oluşan pozitif antikör cevabı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise koyun ve keçilerde türlere, coğrafik konuma, yaşlara göre seropozitiflik oranlarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Fakat Azkur ve ark. (2011)'nin bulgularının aksine bu çalışmada dişi koyunlarda koçlara nazaran daha yüksek antikör pozitiflik oranı tespit edilmiştir (P<0.05). Ancak ırk ve cinsiyetin predispozisyon oluşturduğunu kanıtlar nitelikte yeterince veri olduğunu söylemek doğru olmayacaktır. Çalışmada, dişi koyunlarda enfeksiyon oranının erkeklere göre daha yüksek bulunması, dişilerin enfeksiyona daha duyarlı olduğunu düşündürdürebileceği gibi, bu duruma erkek hayvanların sürüye sadece koç katımı zamanında katılması ve dişilerin sürekli birbirleriyle temas halinde bulunmaları neden olmuş olabilir. Ayrıca dişi koyunların daha sık popülasyonlar halinde tutulmaları, doğum, süt verme gibi hayvanların kondüsyonunu düşüren faktörler dolayısıyla dişi hayvanlar arasında virusun daha fazla sirküle olması cinsiyet farklılığına sebep olarak gösterilebilir. Keçilerde ise enfeksiyon yaygınlığı konusunda istatistiksel olarak cinsiyet farklılığına rastlanmamıştır. Bu bulgular, genel olarak bölgede erkek ve dişi keçilerin bir arada yetiştiriliyor olması koyunlardaki gibi ayrı tutulmaması enfeksiyonun cinsiyet farkından değil, sürü büyüklüğü ve hayvanların sık olarak tutulması ile alakalı olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, Aydın ve İzmir illerinde örneklenen koyun ve keçilerde viremik hayvan tespit edilmemiş olmasına rağmen, keçilerde %42.97 ve koyunlarda %47.29 olarak belirlenen enfeksiyon oranları pestivirusların bölgede sirküle olduğunu göstermektedir. Virusun kolaylıkla bulaşabilmesi nedeniyle sürü içinde insidensin hızla artış gösterebilmektedir. Çalışılan sürülerde aşı yapılmamış olmasına rağmen yüksek titrede Ab taşıyan bireylerin bulunması yakın zamanda virusa maruz kaldıklarını göstermektedir.

Örnekleme zamanında sürülerde akut veya persiste enfekte hayvanlar bulunmamasına rağmen, sürüde daha önce akut enfekte bireylerin var olduğunu söylemek mümkündür. Belirlenen oranlar düşük olmadığı için mera şartlarında diğer sürülerle kontakt gibi yollarla alınmış olması mümkündür. Her ne kadar çalışılan işletmelerde ruminant pestivirus varlığına bağlı olan abort ve anomalili doğumlar bildirilmemiş ise de ilerleyen zamanda ekonomik kayıplara neden olabileceğini mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır. Bu çalışmada ayrıca, küçükbaş hayvan yetiştiriciliği yapan aile işletmeleri ve Aydın Koyun ve Keçi Yetiştiricileri Birliği ile koordineli olarak çalışılmış olup, yetiştiricilere söz konusu enfeksiyon, çalışma sonuçları, ve diğer enfeksiyonlara karşı alınması gereken önlemler konusunda önerilerde bulunulmuştur.

## Teşekkür

Bu çalışma aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir (Proje no: VTF-13039). Çalışmada laboratuvar imkânlarını sunan Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Sibel GÜR'e teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Albayrak H, Özcan E, 2012: The investigation of Pestivirus and Rift Valley Fever Virus infections in aborted ruminant fetuses in the Blacksea Region in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 3, 457-461.
- Ataseven VS, Ataseven L, Tan T, Babur C, Oğuzoğlu TÇ, 2006: Seropositivity of agents causing abortion in local goat breeds in Eastern and Southeastern Anatolia, Turkey. *Rev Med Vet*, 157, 955-961.
- Avcı O, 2010: Konya ve çevresinde abort problemleri koyun sürülerinde border disease virus enfeksiyonunun araştırılması. Doktora tezi. *Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Konya*.
- Azkur AK, Gazyağcı S, Aslan ME, Ünal N, 2011: Molecular and serological characterization of pestivirus infection among sheep in Kirikkale Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17(Suppl A), 83-92.
- Burgu İ, Öztürk F, Akça Y, 1984: Tahirova devlet üretme çiftliği koyunlarında viral enfeksiyonlar üzerinde serolojik araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 31, 2, 167-179.
- Burgu İ, Öztürk F, Akça 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 İ, Özkul A, 1993: Detection by cultural isolation of bovine virus diarrhoea (BVD) virus following field infections in cattle and their fetuses. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 100, 361-363.

- Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoğlu TM, Bilge Dağalp S, Oğuzoğlu TÇ, Yeşilbağ K, 2001: Koyunlarda doğum öncesi ve sonrası dönemlerde bovine viral diarrhea (BVD) virus enfeksiyonunun serolojik virolojik ve patogenezi yönünden araştırılması. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 551-557.
- Carlsson U, 1991: Border Disease in sheep caused by transmission of virus from cattle persistently infected with bovine virus diarrhoea virus. *Vet Rec*, 128, 141-147.
- Carlsson U, Belak K, 1994: Border disease virus transmitted to sheep and cattle by a persistently infected ewe: epidemiology and control. *Acta Vet Scand*, 35, 1, 79-88.
- Gazyacı S, Azkur AK ve Çağlayan O, 2011: Comparison of hematological and biochemical parameters in sheep naturally and persistently infected with a border disease virus. *Trop Anim Health Prod*, 43, 553-556.
- Gür S, 2009: An investigation of border disease virus in sheep in Western Turkey. *Trop Anim Health Prod*, 41, 1409-1412.
- Gür S, Erol N, Yapıcı O, 2009: Afyon, Konya ve Eskişehir illerinde keçilerde pestivirus ve parainfluenzavirus tip 3 enfeksiyonlarının serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 2, 1, 23-27.
- Hasırcıoğlu S, Kale M, Acar A, 2009: Investigation of pestivirus in aborted sheep and goats in Burdur region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 2, 163-167.
- Lindenbach B, Thiel HJ, Rice CM, 2007: Family Flaviviridae, 1101-1133. In: Knipe DM, Howley PM (Eds.), *Fields Virology*, 5th Edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- İssi M, Gülaçtı İ, Kızıl Ö, Karapınar T, Bulut H, Gül Y, 2006: Kliniğimizde gözlemlenen reverze transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile doğrulanan mukoza hastalığı olguları. *Firat Univ Sağlık Bilim Derg*, 20, 253-258.
- İssi M, Gül Y, Gürçay M, Gök T, 2012: Elazığ yöresindeki koyunlarda saptanan pestivirus enfeksiyonu. *Firat Univ Sağlık Bilim Derg*, 26, 3, 165-169.
- Juliá S, Craig MI, Jiménez LS, Pinto, GB ve Weber EL, 2009: First report of BVDV circulation in sheep in Argentina. *Prev Vet Med*, 90, 274-277.
- Krametter-Froetscher R, Duenser M, Preyler B, Theiner A, Benetka V, Moestl K, Baumgartner W, 2010: Pestivirus infection in sheep and goats in West Austria. *Vet J*, 186, 342-346.
- Lamontagne L, Roy R, 1984: Presence of antibodies to bovine viral diarrhoea-mucosaldiseasevirus (Borderdisease) in sheep and goat flocks in Quebec. *Can J Comp Med*, 48, 225-227.
- Löken T, Krosgrud J, Larsen IL, 1991: Pestivirus infections in Norway. Serological investigation in cattle, sheep and pigs. *Acta Vet Scand*, 32, 27-34.
- Mishra N, Pitale SS, Rajukumar K, 2012: Genetic variety of bovine viral diarrhoea virus 1 strains isolated from sheep and goats in India. *Acta Virol*, 56, 209-215.
- O'Neill RG, O'Connor M ve O'Reilly PJ, 2004: A survey of antibodies to pestivirus in sheep in the Republic of Ireland. *Ir Vet J*, 57, 525-530.
- Oğuzoğlu TÇ, Tan MT, Toplu N, Demir AB, Bilge-Dağalp S, Karaoglu T, Ozkul A, Alkan F, Burgu I, Haas L, Greiser-Wilke I, 2009: Border disease virus (BDV) infections of small ruminants in Turkey: A new BDV subgroup. *Vet Microbiol*, 135, 374-379.
- Okur-Gümüşova S, Yazıcı Z, Albayrak H, 2006: Pestivirus seroprevalence in sheep populations from inland and coastal zones of Turkey. *Rev Med Vet*, 157, 595-598.
- Ozan E, Turan HM, Albayrak H, Cavunt A, 2012: Serological determination of pestivirus, bluetongue virus and peste des petits ruminants virus in small ruminants in Samsun province of Turkey. *Atatürk Üniv Vet Bilim Derg*, 7, 1, 27-33.
- Passler T, Riddell KP, Edmondson MA, Chamorro MF, Neill JD, Brodersen BW, Walz HL, Galik PK, Zhang Y and Paul H Walz, 2014: Experimental infection of pregnant goats with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) 1 or 2. *Vet Res*, 45, 38, 1-10.
- Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD, 2008: *Veterinary Medicine*. 10th edition, Edinburgh, London, New York, Oxford, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto: Saunders Elsevier.
- Sawyer MM, Schore CE, Osburn BI, 1991: Border Disease of sheep- Aspects for diagnostic and epidemiologic consideration. *Arch Virol*, Supplementum, 3, 97-100.
- Schaller P, Vogt HR, Strasser M, Nettleton PF, Peterhans E, Zanon R, 2000: Seroprevalence of maedi-visna and border disease in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 142, 145-153.
- Steel RGD, Torrie JH, 1980: *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach*, 2nd Ed. New York.
- Tan MT, Karaoğlu MT, Erol N, Yıldırım Y, 2006: Serological and virological investigations of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infection in dairy cattle herds in Aydın province. *Turk J Vet An Sci*, 30, 299-304.
- Ural K, Ulutaş B, Ulutaş PA, Gültekin M, Atasoy A, 2011: A flock level analysis of an outbreak of natural border disease in sakiz ewes and their progeny. *Acta Sci Vet*, 39, 3, 977.
- Van Oirschot JT, 1983: Congenital infections with non-arbo togaviruses. *Vet Microbiol*, 8, 321- 361.
- Yazıcı Z, Serdar MS, Gümüşova SO ve Albayrak H, 2012: Molecular diagnosis and seroepidemiology of pestiviruses in sheep. *Vet Arhiv*, 82, 35-45.

\*Yazışma Adresi: Nural EROL

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Viroloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye.  
e-mail: nuralerol@adu.edu.tr

# Köpekte Beynin 3 Tesla Manyetik Rezonans ile 3 Boyutlu Multiplanar Rekonstruksiyonu

## Çağdaş OTO

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Geliş Tarihi: 13.01.2017

Kabul Tarihi: 06.02.2017

**Özet:** Bu çalışmanın amacı köpek beyinin 3 boyutlu anatomisinin 3 tesla manyetik rezonans tarama görüntülerinin multiplanar rekonstruksiyonu aracılığıyla in situ olarak gösterilmesidir. Neurocranial yapıların anatomik detaylarının gösterilmesi için 9 adet yetişkin mesaticephalic ırk köpek kullanıldı. Bu amaçla T1 ve T2-ağırlıklı space sekans taramalarının üç boyutlu yeniden şekillendirilmiş görüntülerinden yararlanıldı. 3D-IR-MPR sekansı ile alınan görüntüler, baş ve beyine ait derin yapıların ayrıntılı olarak görüntülenmesini sağladı.

**Anahtar Kelimeler:** Anatomi, Beyin, Köpek, Manyetik Rezonans görüntüleme, Multiplanar rekonstruksiyon.

### 3 Dimentional Multiplanar Reconstruction of the Brain at 3 Tesla Magnetic Resonance in Dog

**Abstract:** The purpose of the study was to show three-dimentional anatomy of the dog brain in situ by using multiplanar reconstruction of the magnetic resonance scanning images at 3 tesla. The nine adult mesaticephalic dogs were used for defining the anatomical details of neurocranial structures. The data are obtained from 3D reformatted images derived by T1 and T2-weighted space sequence scans. Three-dimensional inversion recovery multiplanar reconstruction (3D-IR-MPR) sequence provided excellent visualization for the inner structures of the head and brain.

**Keywords:** Anatomy, Brain, dog, Magnetic resonance imaging, Multiplanar reconstruction.

## Giriş

Manyetik rezonans görüntüleme, yumuşak dokular üzerinde yüksek doku kontrastı gösterebilme özelliği sayesinde günümüzde başta beyin olmak üzere merkezi sinir sistemi ve vücuttaki diğer yumuşak dokuların araştırma, tanı ve tedavi amacıyla görüntülenmesinde en yaygın kullanılan tıbbi görüntüleme yöntemlerinden biridir (Broome ve Broome, 2016; Oto ve ark., 2011; Schmitt ve ark., 2004). Non-invaziv olması, bilinen bir zararının olmaması, gittikçe kısalan tarama süreleri ile elde edilen üstün görüntü kalitesi ve multiplanar 3 boyutlu görüntü alınabilmesi sistemin önemli avantajlarıdır (Broome ve Broome, 2016; Brown, 2016; Schmitt ve ark., 2004;).

Tüm dünyada son 10 yılda insanların yanısıra veteriner hekimlik alanında da MR kullanımı artmaktadır (Oto ve ark., 2011; Schmidt ve ark., 2012; Gray-Edwards ve ark., 2014; Fletcher ve Saveraid, 2016). Beyin ve ilişkili yapılar anatomi eğitiminde evcil memeli örneği olarak kullanılan büyük ruminant Schmidt ve ark., (2012); küçük ruminant Ella ve ark., (2016); Ella ve Keller (2015); Schmidt ve ark., (2012); tektırnaklı Arencibia ve ark., (2001); Chaffin ve ark., (1997); Oto ve Hazıroğlu (2011); Oto (2010); Vazquez ve ark., (2001); domuz Fang ve ark., (2005); Oto ve ark., (2011); Rosendal ve ark., (2009); Watanebe ve ark., (2001); kedi Gray-Edwards ve ark., (2014); Lola ve ark., (1995) ve köpeklerde Assheuer ve ark., (1997); Byeong ve

ark., (2009) ve Fletcher ve Saveraid (2016) tarafından görüntülenmiş ve kesitsel anatomi açısından incelenmiştir. Son yıllarda geliştirilen sekanslar aracılığıyla dokuların normal pozisyonlarındaki üç boyutlu görüntülerinin de MR ile elde edilmesi mümkün olmaktadır (Phal ve ark., 2008; Brown, 2016). Yapılan literatür incelemesinde carnivor örneği olarak modellenen köpeklerde hem anatomi hem de klinik bazlı çok sayıda MR araştırması olmasına karşın beyin ve ilişkili yapıların 3 boyutlu görüntülerini içeren çalışmaların eksik olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmanın amacı köpek kafasının MR taraması ile elde edilecek 3 boyutlu görüntüler üzerinden özellikle anatomi eğitiminde, kafatası içerisinde tamamen kapalı olarak konumlanmış ve karmaşık bir yapıya sahip beyin gibi bir organın anatomisinin ve çevresindeki yapılarla ilişkisinin anlaşılmasını kolaylaştıracak bir referans oluşturmaktır.

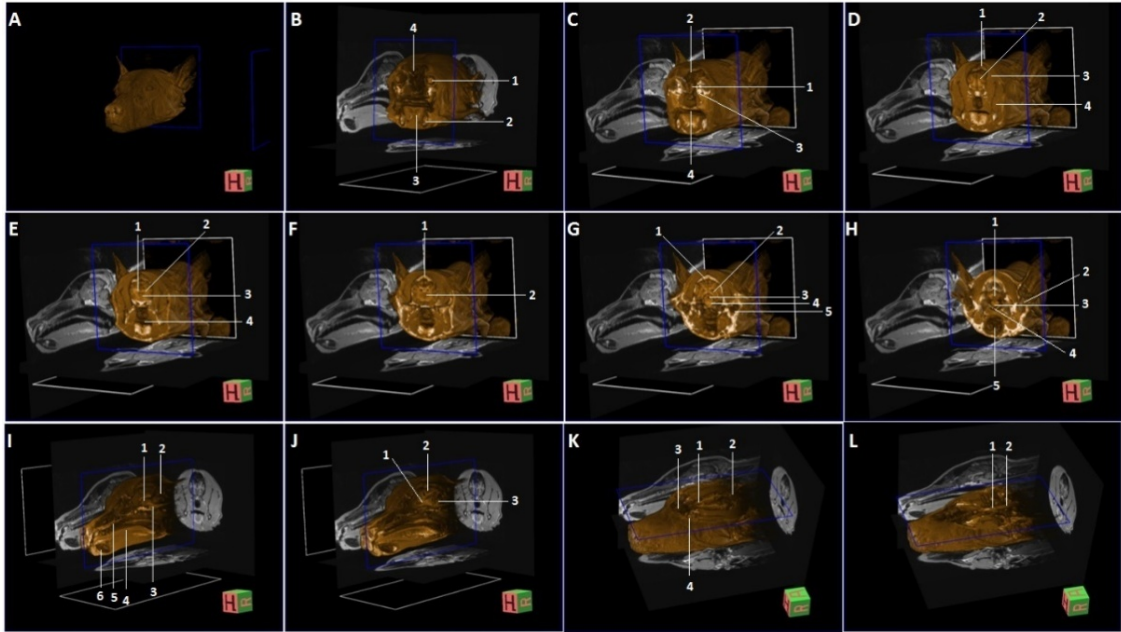
## Materyal ve Metot

Çalışmada Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 2016/44 sayılı izni ile herhangi bir merkezi sinir sistemi hastalığı gözlenmeyen, 6 adet yetişkin mesaticephalic iri ırk köpek ile 3 adet Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda kadavra olarak değerlendirilen köpek başı kullanıldı. Çalışma için

Atropin+Ksilazin+Dormitol kombinasyonu ile premedikasyon ve sedasyonu sağlanan köpekler ve kadavralara ait başlar prone pozisyonda yerleştirildikten sonra, 3 Tesla MR (Trio, Siemens, Erlangen, Germany) ile 32 kanallı insan kafa koili kullanılarak tarandı. Dorsal, sagittal ve transversal düzlemler üzerinde T1-ağırlıklı space ve T2-ağırlıklı space sekansları ile alınan görüntülerin, sistem dahilindeki Leonardo Workstation yazılımı (Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) vasıtasıyla 3 boyutlu rekonstruksiyon yapıldı. Taramalar sırasında T1-ağırlıklı görüntüler için parametreler; TE: 12 ms; TR: 600 ms; ; Kesit Kalınlığı: 1 mm; FOV: 230×230 mm; Kesit sayısı: 125, Tarama süresi; 8 dakika, T2-ağırlıklı görüntüler için parametreler; TE: 404 ms; TR: 3000 ms; ; Kesit Kalınlığı: 1 mm; FOV: 230×230 mm; Kesit sayısı: 125 Tarama süresi; 11 dakika olarak belirlendi. Görüntüler üzerinde anatomik yapıların belirlenmesi ve isimlendirilmesi anatomi kitapları De lahunta, (1997) ve atlasları Popesko, (1979), MR atlasları Assheuer ve ark., (1997) ve Nomina Anatomica Veterinaria, (2012) temel alınarak yapıldı.

## Bulgular

MR ile üç düzlemde alınan T1 ve T2 ağırlıklı görüntüler üzerinde köpek beyninin kafatası içindeki ölçüleri uzunluk (mid-sagittal düzlemde bulbus olfactorius'dan foramen magnum seviyesine kadar olan mesafe)  $96\pm 1.7$  mm; yükseklik (gl.pinealis seviyesinden geçen transversal kesitlerde en geniş iki nokta arası)  $51\pm 0.9$  mm; genişlik (lobus piripormis seviyesinden geçen dorsal kesitlerde en geniş iki nokta arası)  $62\pm 1.1$  mm olarak belirlendi. Köpek başlarının T1-ağırlıklı taramaları sonrası rekonstruksiyonu ile elde edilen renklendirilmiş 3 boyutlu görüntülerde (Şekil 1.A) neurocranial yapılar ait anatomik detaylar transversal, sagittal ve dorsal düzlemler üzerinde incelendi ve işaretlendi. Bu görüntülerde beyin dokusunun cihazın sağladığı yüksek doku kontrastı sayesinde diğer çevre dokulardan (kafatası kemikleri, kaslar, yağ dokusu, meninges ve BOS) rahatlıkla ayrılabilirdiği görüldü (Şekil 1.B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L).



**Şekil 1.** A-Renklendirilmiş 3B rekonstruksiyon; B-Bulbus oculi seviyesinden geçen transversal görüntü, 1. Lens, 2. Mandibula, 3. Lingua, 4. Sinus frontalis; C- Bulbus olfactorius seviyesinden geçen transversal görüntü, 1.Bulbus olfactorius, 2.Sinus frontalis, 3. Corpus adiposum intraorbitale, 4. Palatum molle; D-Frontal lob seviyesinden geçen transversal görüntü, 1. Os frontale, 2. Substantia grisea, 3. M.temporalis, 4. M.massater; E-Nucleus caudatus seviyesinden geçen transversal görüntü, 1.Corpora callosum, 2. Substantia alba, 3. Nucleus caudatus, 4. Oropharynx; F-Thalamus seviyesinden geçen transversal görüntü, 1. Os parietale, 2. Thalamus; G- Crus cerebri seviyesinden geçen transversal görüntü, 1. Os parietale, 2. Hippocampus, 3. Aqueductus mesencephali, 4. Crus cerebri, 5. Cavum tympani; H-Cerebellum seviyesinden geçen transversal görüntü, 1. Cerebellum, 2. Meatus acusticus externus, 3. Medulla oblongata, 4. Os sphenoidale, 5. Laryngopharynx; I-Mid-sagittal görüntü, 1. Adhesio interthalamica, 2. Cerebellum, 3. Pons, 4. Lingua, 5. Palatum durum, 6. Mandibula; J-Paramedian görüntü, 1.Capsula interna, 2. Sulcus cerebri, 3. Corpus medullare cerebelli; K-Bulbus oculi seviyesinden geçen dorsal görüntü, 1. Tractus olfactorius, 2. Cerebellum, 3. Cavum nasi, 4. Lens; L-Gl.pituitaria seviyesinden geçen dorsal görüntü, 1. Gl.pituitaria, 2. Medulla oblongata.

Benzer olarak beyinde substatia grisea'nın da substantia alba'dan daha hipointens olarak tarandığı ve bu sayede iki bölüm arasında doku görüntü farklılıklarının ayrılabilirdiği saptandı (Şekil 1.D-2, E-2). Her üç düzlem üzerinde değişik seviyelerden geçen kesitlerde hemispherium cerebri, cerebellum (Şekil 1.H-1, I-2, K-2) ve beyin kökü yanısıra beyin ventrikülleri ve BOS (Şekil 1.G-3) görüntülendi. Buna ek olarak özellikle transversal kesitlerde bulbus olfactorius, nucleus caudatus, thalamus, corpus callosum, tectum mesencephali gibi derin cerebral yapıların anatomik detayları 3 boyutlu görüntüler üzerinde belirlendi ve işaretlendi. Sagittal düzlem üzerindeki kesitler beyin yanında, cavum nasi, palatum, lingua gibi viscerocranium'a ait anatomik yapıların da aynı kesitlerde izlenmesine olanak verdi. Dorsal düzlem kesitlerinde ise beyin ile bulbus oculi'nin görüntülenmesi yapıldı.

Renklendirilmiş görüntülerde kemik korteksi isointens, medullar kısım yoğun hiperintens olarak taranırken kemik doku içindeki hava boşlukları (sinus paranasales) işlenmemiş ham görüntülerden farklı olarak üç boyutlu görüntüleme nedeniyle renksizdi ve boşluk olarak gözlendi (Şekil 1.B-2, B-4). Bu bağlamda beyni çevreleyen neurocranium yanında maxilla ve mandibula da kolayca çevre dokulardan ayrıldı. Taramalarda genel olarak yağ dokusu hiperintens, kas dokusu hipointens görüntü karakterine sahipti. Özellikle bulbus oculi'nin etrafını çevreleyen intraorbital yağ dokusu parlak beyaz (Şekil 1 C-3), mandibula ve os temporale üzerinde yer alan çiğneme kasları homojen kahverengi tonlarda izlendi (Şekil 1.D-3, D-4).

## Tartışma ve Sonuç

Arencibia ve ark. (2001); Vasquez ve ark. (2001) ve Oto ve ark. (2011) T1-ağırlıklı taramaların anatomik detay açısından T2-ağırlıklı taramalardan daha üstün olduğunu belirtmiş; düzlemler açısından ise transversal düzlem kesitlerinin özellikle derin cerebral yapıların anatomilerinin anlaşılmasında daha yararlı olacağını vurgulamıştır. Yapılan çalışmada T1-ağırlıklı taramaların ve bunlardan rekonstrükte edilen görüntülerin daha fazla anatomik detay verdiği, benzer biçimde yapıların ilişkilendirilmesinde transversal kesitlerin diğer düzlem görüntülerine göre daha anlaşılır olduğu görüldü.

Canlı köpeklerde yapılan yüksek çözünürlüklü taramalar ile karşılaştırıldığında Assheuer ve ark. (1997); Byeong ve ark. (2009) anatomi eğitimi için yapılacak kafa MRG işlemlerinde, ötenazi yapılmış hayvanlara ait görüntülerin de daha önce yapılan çalışmaları destekler biçimde Schmidt ve ark. (2012) tatmin edici anatomik detay sağladığı belirlendi.

Sonuç olarak günümüzde, azalan maliyetlere ve tarama sürelerine bağlı olarak yaygınlaşan kullanımı ve yüksek doku kontrastı sağlayabilmesi gibi avantajları nedeniyle MRG veteriner hekimlik alanında da rutin görüntüleme yöntemleri arasına girmiştir. MRG ile sağlanan ham verilerin rekonstrüksiyonu sonucu elde edilen üç boyutlu görüntülerin, hem klinikte baş bölgesine ait özellikle tümör benzeri fiziksel patolojilerin tanısı ve operasyon planlamasının yapılmasında, hem de veteriner anatomi eğitiminde beyin ve ilişkili yapıların daha kolay anlatılması ve anlaşılması açısından önemli bir kaynak olarak kullanılabileceği düşünülmektedir.

## Teşekkür

Bu çalışmaya katkılarından dolayı UMRAM direktörü Prof. Dr. Ergin ATALAR'a, Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Girişimsel Radyoloji Bölümü öğretim üyesi Doç. Dr. Oktay ALGIN'a ve UMRAM sorumlu radyoloji teknikeri Musa KURNAZ'a teşekkür ederiz.

## Kaynaklar

- Arencibia A, Vasquez JM, Ramirez JA, Ramires G, Vilar JM, Rivero MA, Alayon S, Gil F, 2001: Magnetic resonance imaging of normal equine brain. *Vet Radiol Ultrasound*, 42, 405-408.
- Assheuer J, Sager M 1997: MRI and CT Atlas of the Dog. 1st Ed., Blackwell Wissenschafts, Berlin.
- Broome M, Broome N, 2016: "MRI". <http://www.avmi.net/services/mri>, Erişim tarihi; 15.11.2016
- Brown G, 2016: "Multiplanar reconstructed magnetic resonance imaging as a tool for anatomical investigation". <http://www.ismrm.org/smrt/08/smrt.doc/>, Erişim tarihi; 15.11.2016.
- Byeong TK, Ki JK, Dong PJ, Han JY, Lim CY, Park C, Yoo JH, Kim JW, Jung DI, Kim YB, Woo EJ, Cho ZE, Park HM, 2009: Magnetic Resonance Imaging of the Canine Brain at 7T. *Vet Radiol Ultrasound*, 50, 615-621.
- Chaffin MK, Walker MA, McArthur NH, Perris EE, Matthews NS, 1997: Magnetic resonance imaging of the brain of normal neonatal foals. *Vet Radiol Ultrasound*, 38, 102-111.
- De Lahunta A, 1997: Veterinary Neuroanatomy and Clinical Neurology. 3rd Ed., W.B.Saunders Company Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Sydney, Tokyo.
- Ella A, Delgadillo JA, Chemineau P, Keller M, 2016: Computation of a High-Resolution MRI 3D Stereotaxic Atlas of the Sheep Brain. *J Comp Neurol*, 525,3, 676-692.
- Ella A, Keller M, 2015: Construction of an MRI 3D high resolution sheep brain template. *Magnetic Resonance Imaging*, 33, 1329-1337.
- Fang M, Li J, Gong X, Antonio G, Lee F, Kwong WH, Wai SM, Yew DT, 2005: Myelination of the pig's brain: A

- correlated MRI and histological study. *Neurosignals*, 14, 102-108.
- Fletcher TF, Saveraid TC, 2016: Canine Brain Mri Atlas. <http://vanat.cvm.umn.edu/mMRIBrain/>, Erişim tarihi; 15.11.2016
- Gray-Edwards HL, Salibi N, Josephson EM, Hudson JA, Cox NR, Randle AN, McCurdy VJ, Bradbury AM, Wilson DU, Beyers RJ, Denney TS, Martin DR, 2014: High resolution MRI anatomy of the cat brain at 3 Tesla. *Journal of Neuroscience Methods*, 227, 10-17.
- International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina Anatomica Veterinaria* (N.A.V.), 2012: 6th Ed., Hannover, Columbia, Gent, Sapporo: World association of Veterinary Anatomists.
- Hudson, LC, Cauzinille L, Kornegay JN, 1995: Magnetic resonance imaging of the normal feline brain. *Vet Radiol Ultrasound*, 36, 267-275.
- Oto C, Ekim O, Algin O, Şenel OO, İnce N, Hazıroğlu RM, 2011: 3 Tesla Magnetic resonance imaging and multiplanar reconstruction of the brain and its associated structures in pig. *Vet J Ankara Univ*, 58, 73-78.
- Oto C, Hazıroğlu RM, 2011: Magnetic resonance imaging of the guttural pouch (diverticulum tubae auditivae) and its related structures in donkey (*Equus asinus*). *Vet J Ankara Univ*, 58, 1-4.
- Oto C, 2010: Magnetic resonance imaging of the brain in donkey. Proceeding "The XXVIIth Congress of the European Association of the Veterinary Anatomists, 28-31 July, Paris". *Anat Histol Embryol*, 39, 311.
- Phal PM, Usmanov A, Nesbit GM, Anderson JC, Spencer D, Wang P, Helwig JA, Roberts C, Hamilton BE, 2008: Qualitative comparison of 3-T and 1,5-T MRI in the evaluation of epilepsy. *Neuroradiol*, 191, 890-895.
- Popesko P, 1979: Atlas of topographical anatomy of the domestic animals. Vol. 1, Head and Neck. 1st Ed., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart.
- Rosendal F, Pedersen M, Sangill R, Stødkilde-Jørgensen H, Nielsen MS, Bjarkam CR, Sunde N, Sørensen JC, 2009: MRI protocol for in vivo visualization of the Göttingen minipig brain improves targeting in experimental functional neurosurgery. *Brain Res Bull*, 79, 41-45.
- Schmidt MJ, Langen N, Klumpp S, Nasirimanesh F, Shirvanchi P, Ondreka N, Kramer M, 2012: A study of the comparative anatomy of the brain of domestic ruminants using magnetic resonance imaging. *The Veterinary Journal*, 191, 85-93.
- Schmitt F, Grosu D, Mohr C, Purdy D, Salem K, Scott KT, Stoeckel B, 2004: 3 Tesla MRI: successful results with higher field strengths: High field MR. *Der Radiologe*, 44, 31-48.
- Vazquez JM, Rivero M, Gil F. 2001: Magnetic resonance imaging of two normal equine brains and their associated structures. *Vet Rec*, 148, 229-232.
- Watanabe H, Andersen F, Simonsen CZ. 2001: MR-based statistical atlas of the Göttingen minipig brain. *Neuroimage*, 14, 1089-1096.

**Yazışma Adresi:** Çağdaş OTO  
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Anatomi Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.  
e-mail: coto@ankara.edu.tr

## Sığırlarda Oküler ve Perioküler Tümörlerin Klinik ve Histopatolojik Değerlendirilmesi

Ünal YAVUZ<sup>1\*</sup>, Nihat YUMUŞAK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 16.01.2017

Kabul Tarihi: 15.02.2017

**Özet:** Bu çalışmada oküler ve perioküler tümürlü 9 sığırın klinik ve histopatolojik özellikleri ile uygulanan eksizyon ve enüklasyon sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlandı. Tedavi amacıyla 4 vakada lokal tümör eksizyonu ve 4 vakada göz enüklasyonu uygulanırken 1 vakada bulbus okuli ve çevre dokulardaki geniş tümör invazyonlarından dolayı kesime sevk önerildi. Histopatolojik muayenede 4 vakada yassı hücreli kanser, 2 vakada indifferensiyel yassı hücreli kanser, 1 vakada melanom ve 2 vakada malign melanom tespit edildi. Oküler ve perioküler tümörlerin farklı ırklarda görülmesine rağmen en fazla Holstein ırkında karşılaşıldığı saptandı. Ayrıca vakaların çoğunun yassı hücreli kanser olması da dikkat çekti. Etkilenen hayvanların tamamının dişi ve ortalama yaş aralığının 4.78 olduğu gözlemlendi. Opere edilen hayvanlar ortalama 6 aya kadar takip edildi ve nüks veya metastaz yönünden net bir bulguyla karşılaşmadı. Sonuç olarak oküler ve perioküler tümörlerin tedavisinde eksizyon ve enüklasyon maliyeti düşük, basit ve az ekipmanla kolay uygulanabilir cerrahi yöntemlerdir. Ayrıca bu yöntemlerin oküler ve perioküler tümörlerde ağrıyı azaltmak, hayvanın yaşam kalitesini yükseltmek, verim süresini arttırmak ve ekonomik kayıpları azaltmak amacıyla kullanılabilceği gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Eksizyon, Enüklasyon, Oküler Tümör, Sığır.

### Clinical and Histopathological Evaluation of Bovine Ocular and Periocular Tumors

**Abstract:** In this study, we aimed to evaluate clinical and histopathological features and the results of applied excision and enucleation of ocular and periocular tumors in 9 cattle. For treatment purposes, local excision of the tumor in 4 cases and eye enucleation in 4 cases were applied. In one case, slaughter was recommended because of the extensive tumor invasion of bulbus oculi and surrounding tissues. Squamous cell carcinoma in 4 cases, indifferential squamous cell carcinoma in 2 cases, melanoma in 1 case and malignant melanoma in 2 cases were detected in the histopathological examination. Although the ocular and periocular tumors are seen in different breeds, it was noted that they were most encountered in Holstein breed. It was also noticed that the majority of the such cases were squamous cell carcinomas. It was observed that the entire affected animals were female and average age range was 4.78 years. Operated animals were followed approximately up to six months and no recurrence or metastasis was encountered during period. In conclusion, excision and enucleation in the treatment of ocular and periocular tumors are surgical methods that are simple, with low cost and easily performed with less equipment. In addition, these methods can be used to reduce of pain, improve the quality of life of the animal, increase the yield period and reduce economic losses in ocular and periocular tumors.

**Keywords:** Excision, Enucleation, Ocular Tumor, Cattle.

### Giriş

Oküler ve perioküler tümörler orbita, gözkapakları, konjunktiva, kornea ve intraoküler dokularla bağlantılı olarak yapısal değişiklikler ile ağrıya neden olurlar. Gözün fonksiyonunu ve görüşü etkilediklerinden dolayı küçük tümörler bile önemli olarak kabul edilirler (Dubielzig, 2002). Tüm hayvan türlerinde görüldüğü, çiftlik hayvanı türleri arasında ise en sık sığırlarda karşılaşıldığı bildirilmiştir. Sığırlarda en fazla etkilenen bölge gözkapakları, kornea ve üçüncü göz kapağıdır (Canpolat ve ark., 2007; Martins ve Barros, 2014; Ozmen ve ark., 2016; Sabri ve ark., 2010; Tsujita ve Plummer, 2010).

Sığırlarda oküler ve perioküler dokularda karşılaşılan en yaygın tümörlerin kanser göz olarak da bilinen yassı hücreli kanser ve lenfosarkom olduğu bildirilmiştir (Crispin, 2005; Dubielzig, 2002; Gelatt, 2005; Gharagozlu ve ark., 2007;

Hirsbrunner ve ark., 1998; Martins ve Barros, 2014; Robert, 2002; Schulz ve Anderson, 2010). Daha nadir olarak melanom, lenfom, hemangioendotelyom, malign hemangioendotelyom, skuamöz papillom, sebaceöz gland karsinom, fibrom, mastositom ve optik sinir nöroepitel-yomuyla karşılaşılmaktadır (Gharagozlu ve ark., 2007; Martins ve Barros, 2014; Robert, 2002; Schulz ve Anderson, 2010; Wilcock, 1993). Orbital ve periorbital tümürlü sığırlarda tümörün lenf nodülleri, iç organlar, kaslar ve diğer dokulara metas-tazi durumunda kaşeksi, verim kaybı ve karkas kalitesinin düşmesinden dolayı önemli ekonomik kayıplar oluşmaktadır (Gelatt, 2005; Robert, 2002). Oküler ve perioküler lezyonların tedavisi amacıyla enüklasyon, kriyoterapi, hipertermi, radyasyon terapisi, immünoterapi veya



bulbunların kombinasyonu kullanılabilir. Bulbus okulideki ileri lezyonları sınırlamak, ağrılı oftalmik lezyonları ortadan kaldırmak ve yassı hücreli kanser gibi tümörlerin ilerlemesini durdurmak için en sık kullanılan cerrahi yöntem enüklasyondur (Al-Asadi, 2012; Gelatt, 2005; Sağlıyan ve ark., 2010; Schulz ve Anderson, 2010). Bu çalışmada sığırlarda oküler ve perioküler tümörlerin klinik ve histopatolojik özelliklerinin değerlendirilmesi, tedavide uygulanan cerrahi eksizyon ve enüklasyon sonuçlarının aktarılması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmanın materyalini 2015-2016 yıllarında Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi cerrahi kliniğine oküler ve perioküler dokularda kitlesel oluşum şikâyetleriyle muayene ve tedavi için getirilen farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki 9 adet sütçü sığır oluşturdu (Tablo 1). Bu çalışma klinik tanı amaçlı yapıldığından Etik Kurul Belgesine ihtiyaç duyulmamıştır.

**Tablo 1.** Oküler ve perioküler tümürlü 9 vakanın klinik ve histopatolojik özellikleri.

Vaka No.	İrk, Yaş, Cinsiyet	Etkilenen Göz		Tümörün Klinik Görünümü	Histopatolojik Tanı	Tümör Lokalizasyonu	Cerrahi Müdahale
		Sağ	Sol				
1	Güney Anadolu Kırmızı, 2 Yaş, ♀		X	Nodüler ve hemorajik	Yassı Hücreli Kanser	Bulbar konjunktiva, kornea, limbus	Enüklasyon
2	Holstein, 4 Yaş, ♀	X		Yüzeyden taşkın, eroziv ülseratif ve yer yer kanamalı	İndiferensiye Yassı Hücreli Kanser	Membrana niktitans ve alt/üst palpebral konjunktiva	Enüklasyon
3	Holstein x Simental Melezi, 5 Yaş, ♀		X	Nodüler ve hemorajik	Melanom	Alt palpebral konjunktiva	Lokal eksizyon
4	Montafon, 5 Yaş, ♀	X		Nodüler ve hiperemik	Malign Melanom	3. göz kapağı	Lokal eksizyon
5	Holstein, 4 Yaş, ♀		X	Multilobuler ve ülseratif	Yassı Hücreli Kanser	3. göz kapağı ve alt palpebral konjunktiva	Lokal eksizyon
6	Holstein, 8 Yaş, ♀	X		Nodüler ve hemorajik	Yassı Hücreli Kanser	Membrana niktitans ve alt/üst palpebral konjunktiva	Enüklasyon
7	Holstein, 6 Yaş, ♀	X		Nodüler ve hiperemik	Yassı Hücreli Kanser	3. göz kapağı ve alt/üst palpebral konjunktiva	Enüklasyon
8	Holstein, 4 Yaş, ♀	X		Lobüler ve ülseratif	Malign Melanom	3. göz kapağı	Lokal eksizyon
9	Simental, 5 Yaş, ♀	X		Yüzeyden taşkın, eroziv, purulent akıntıyla birlikte kanamalı	İndiferensiye Yassı Hücreli Kanser	Tüm bulbus okuli ve perioküler dokular	Bulbus okulide geniş lezyondan dolayı operasyon yapılmadı

Vakaların anamnezine göre kırmızı-pembe renkli anormal doku kitle ve şişkinlikleri, ortalama 4-11 ay arasında devam etmekteydi. Süt veriminde azalma, ağırlık kaybı, irinli akıntı, değişen karakterde gözyaşıyla birlikte zamanla çoğalan progresif genişleyen hafif çıkıntılı lezyonlar şeklindeydi (Şekil 1, 2). Oluşan kitleler oküler ve perioküler dokuların fonksiyonunu etkilemekte ve değişik derecelerde görüşü engellemekteydi.

**Cerrahi Yöntem:** Tedavi amacıyla 4 vakada lokal tümör eksizyonu ve 4 vakada göz enüklasyonu uygulanırken 1 vakada bulbus oculi ve çevre dokulardaki geniş tümör invazyonlarından dolayı kesime sevk önerildi. Tüm cerrahi müdahaleler için 0.1 mg/kg dozunda kasiçi yolla ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer, Türkiye) ile sedasyon uygulandı. Lokal eksizyonda 3. göz kapağı tabanına lidokain HCL %2 (Adokain, Sanovel, Türkiye) enjekte edilerek lokal infiltrasyon anestezi sağlandı. 3. göz kapağı penslerle tutularak dışa doğru çekildi ve küt uçlu eğri makaslar kullanılarak tümöral kitlenin

arkasında taban kısmından eksize edildi. Adrenalin emdirilmiş steril hidrofik gazlı bezle tampon yapılarak kanamalar kontrol edildi. Postoperatif dönemde 5 gün süreyle basitrasin 2500 U.I. ve neomisin sülfat 25 mg (Thiocilline®, İbrahim Hayri, Türkiye) içeren göz pomadı uygulandı.

Enüklasyon da ise lidokain HCL %2 (Adokain, Sanovel, Türkiye) ile retrobulbar blok anestezi uygulandı. Alt ve üst gözkapaklarının sürekli dikişle birbirine dikilmesinin ardından gözkapakları sınırından 1 cm uzaklıkta eliptik ensizyon yapıldı. Küt diseksiyonla retrobulbar dokular ve bulbus okuli çevresindeki kaslar diseke edildi. Muskulus retraktor bulbi ve nervus optikus, eğri uçlu penslerle tespit edilerek pensler ve bulbus okuli arasından kesildi. Bulbus okuli orbitadan dışa doğru çekildikten sonra 3. göz kapağı ve harder bezi uzaklaştırıldı. Kanamalar kontrol edildi ve medial açıda fitil dren için küçük bir açıklık bırakılarak gözkapakları basit ayrı dikişlerle birbirine dikildi (Shaw-Edwards, 2010; Weaver ve ark., 2005). Postoperatif dönemde tüm vakalara prokain

penisilin G ve benzatin penisilin G (Procastrep®, Vetaş, Türkiye) 10.000 IU/kg, dihidrostreptomisin sülfat 10 mg/kg dozda kasiçi yolla 5 gün ve meloksikam (Metacam®, B. Ingelheim, Türkiye) 5 mg/kg dozda damar içi tek enjeksiyon şeklinde kullanıldı. Operasyon sonrası 6. aya kadar hasta sahiplerinden bilgi alınarak vakalar takip edildi.

**Histopatolojik Yöntem:** Cerrahi müdahaleyle alınan 9 biyopsi örneği histopatolojik muayene için patoloji laboratuvarına gönderildi. %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edilen örnekler rutin patoloji doku takibine alındı ve parafinde bloklandı. Hazırlanan bloklardan Leica RM 2125 RT microtome ile 5 mikron kalınlığında seri kesitler alınarak

deparafinize ve dehidrasyon amacıyla ksilolden ve dereceli alkol (%50, %75, %96, %100) serilerinden geçirilerek hematoksilin-eosin (H&E) ile boyandı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopta (Olympus BX53) ve yüksek çözünürlüklü kamera altında (Olympus DP73) X20 ve X40 objektifler ile incelendi.

## Bulgular

Cerrahi müdahale gerçekleştirilen 9 sığırdan oküler ve perioküler tümörlerin klinik ve histopatolojik karakteristikleri ile uygulanan tedavi prosedürü Tablo 1'de özetlenmiştir.



Şekil 1A. Vaka 4 Operasyon öncesi tümörün klinik görünümü.

Şekil 1B. Operasyon sonrası 6. ay görünümü.



Şekil 2A. Vaka 5 Operasyon öncesi tümörün klinik görünümü.

Şekil 2B. Operasyon sonrası 6. ay görünümü.

**Klinik Bulgular:** Hayvanlar ırklara göre incelendiğinde beşinin holstein, birinin simental, birinin Holstein-simental melezi, birinin Güney Anadolu Kırmızısı, birinin Montafon ırkı ve tamamının dişi cinsiyette olduğu belirlendi. Yaşlara bakıldığında birinin 2 yaş, üçünün 4 yaş, üçünün 5 yaş, birinin 6 yaş, birinin 8 yaş olduğu tespit edildi. Lezyonların altısı sağ gözdeyken üçünün sol gözde olduğu gözlemlendi.

Operasyon sonrası 6. aya kadar yapılan takiplerde olası metastaz, tümör tekrarı veya komplikasyon yönünden herhangi bir bulguyla karşılaşmadı. Çalışmada değerlendirilen 9 sığırdan 6 aylık süre içerisinde metastaz, tümör tekrarı ve komplikasyon parametrelerinde olumsuz bir

bulguyla karşılaşmadığından herhangi bir istatistiksel analize gerek duyulmamıştır.

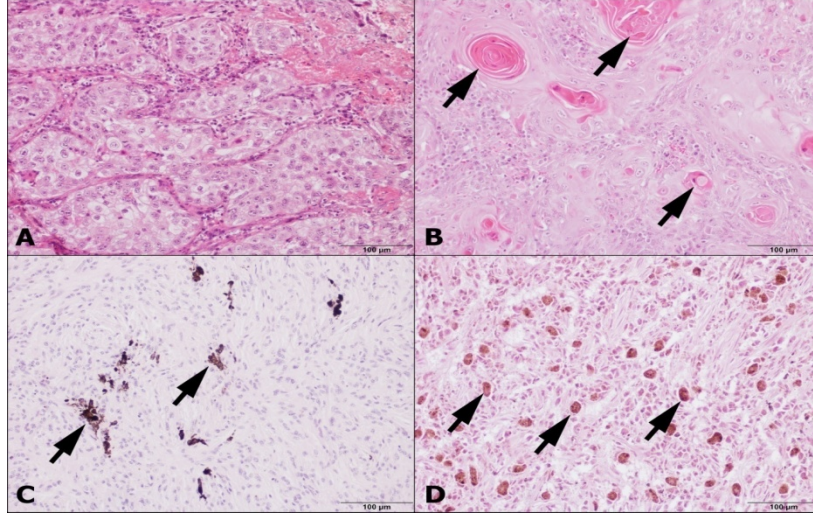
**Histopatolojik Bulgular:** Histopatolojik muayeneye göre 4 vakada yassı hücreli kanser, 2 vakada indifferansiye yassı hücreli kanser, 1 vakada melanom ve 2 vakada malign melanom teşhis edildi.

Yassı hücreli kanser olgularında (Vaka 1, 5, 6, 7) epidermisin bir bölgede bütünlüğünü kaybettiği ve bu bölgede çok sayıda hücre artıkları ile nötrofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonları görüldü. Ayrıca hiperkromatik çekirdekli, büyük, ovoid şekilli, solgun eozinofilik sitoplazmalı anaplastik epitel hücrelerinden oluşan neoplastik

hücre adacıklarının merkezinde keratin birikimleri (glob corne) dikkati çekti (Şekil 3B).

İndiferensiyel yassı hücreli kanser olgularında (Vaka 2, 9) çok sayıda hiperkromatik çekirdekli, büyük, ovoid şekilli, solgun eozinofilik sitoplazmalı

str. spinozum hücrelerinden oluşan neoplastik hücrelerin adacıklar şeklinde dizildikleri ve yer yer bu adacıkların arasında lenfosit, makrofaj ve tek tük nötrofil lökositlerden oluşan yangısal hücre infiltrasyonları dikkati çekti (Şekil 3A).



**Şekil 3** A. İndiferensiyel yassı hücreli kanser: Adacıklar şeklinde dizilmiş anaplazik skuamöz hücreler. HxE. B. Yassı hücreli kanser: Çok sayıda atipik skuamöz hücre adacıkları arasında globe corne yapıları (oklar). HxE. C. Melanom: Geniş stroma arasında melanositik hücreler (oklar). HxE. D. Malign melanom: Çok sayıda gelişmiş dağılım gösteren anaplazik melanositik hücreler (oklar). HxE.

Melanom olgularında (Vaka 3) epidermis ve dermiste çok sayıda koyu kahve-siyahımsı renkte, lapa ya da granüler tarzda melanin pigmenti içeren, çevresinden bağdokudan kapsülle çevrelenmiş atipik melanositlere rastlandı (Şekil 3C).

Malign melanom olgularında (Vaka 4, 8) geniş trabekül yapılarının aralarında değişik yönlere seyreden trabeküller arasında çok sayıda koyu kahve-siyahımsı renkte, lapa ya da granüler tarzda melanin pigmenti içeren pleomorfik melanositik hücrelerle karşılaşıldı (Şekil 3D).

## Tartışma ve Sonuç

Oküler ve perioküler bölgeden köken alan tümörlerle ilgili yaptığımız çalışmada literatür verileriyle uyumlu olarak en fazla yassı hücreli kanser (kansere göz) vakalarıyla karşılaşıldı (Ceylan ve ark., 2011; Crispin, 2005; Dubielzig, 2002; Gelatt, 2005; Gharagozlu ve ark., 2007; Martins ve Barros, 2014). Pugliese ve ark. (2014) İtalya'nın güney Sicilya bölgesinde Simental ırkında yaptıkları çalışmada karşılaştıkları oküler ve perioküler tümörlerin tamamının yassı hücreli kanser olduğunu belirtmişlerdir. Den Otter ve ark. (1995) tarafından yapılan çalışmada ise periorbital beyaz deriye sahip simental ırkında daha çok yassı hücreli kanser görüldüğü, periorbital pigmentli deriye sahip diğer sığır ırklarında ise daha az görüldüğü bildirilmiştir.

Oküler ve perioküler bölgede karşılaşılan tümörlerle ilgili yapılan çalışmalarda Ceylan ve ark. (2011) Holstein ırkında (%67), Gharagozlu ve ark. (2007) ise periorbital siyah deriye sahip Holstein Friesian ırkında daha fazla karşılaştıklarını belirtmiştir. Çalışmamız bu çalışmalarla uyumlu şekilde Holstein ırkı sığırlarda oküler ve perioküler tümörlerle daha sık (%55.56) karşılaşıldığını göstermektedir.

Yassı hücreli kansere 4 yaşından itibaren rastlanıldığı en sık olarak 7-9 yaş aralığında Hereford, Simental, Holstein-Friesian ırklarında görüldüğü ve diğer ırklarda nadir karşılaşıldığı bildirilmiştir (Al-Asadi, 2012; Ceylan ve ark., 2011; Crispin, 2005; Dubielzig, 2002; Gelatt, 2005; Gharagozlu ve ark., 2007; Pugliese ve ark., 2014). Mevcut çalışmada tespit edilen oküler ve perioküler tümörlerin yaş, cinsiyet ve etkilenen göz yönünden elde edilen bulguların dağılımı literatür verileriyle uyum sağlamaktadır. Yassı hücreli tümörler multifaktöriyel bir etiyolojiye sahiptir ve kalıtım, güneş ışığı, beslenme, göz kapağı pigmentasyonu, çevresel koşullar etiyolojide önemli rol oynamaktadır. UV ışığa maruz kalma ve yüksek enerjili rasyonlarla beslenme tümör oluşumunu hızlandırmaktadır (Al-Asadi, 2012; Crispin, 2005; Dubielzig, 2002; Gelatt, 2005). Ceylan ve ark. (2011) tarafından yapılan çalışmada yüksek rakım, ekvatora coğrafi yakınlık, yüksek ortalama sıcaklıklar, hayvanların güneş altında uzun süre otlamadan dolayı yoğun solar radyasyona maruz

kalmasının oküler ve perioküler tümörlere predispozisyon sağladığı bildirilmiştir. Gharagozlu ve ark. (2007) İran'da yapmış oldukları çalışmada sıcak ve kuru iklim koşullarına sahip Tahran ilinde sütçü sığırlarda oküler tümörlere daha fazla rastlandığı, coğrafi koşullara göre oküler tümör insidensinin değiştiği, sıcak ve kuru bölgelerde güneş ışığına daha uzun süre maruz kalmanın predispoze bir faktör olarak etkidiğini bildirmiştir. Tsujita ve Plummer (2010) tarafından Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan araştırmada ise coğrafi olarak yassı hücreli kanser prevalansının değiştiği, bu değişimde coğrafi şartların etkili olduğu, ülkenin güneybatı bölgesinin yüksek rakım ve düşük enleme sahip olmasından dolayı daha yüksek seviyede güneş ışığına maruz kaldığı, bu durumda oküler tümörleri tetiklediği bildirilmiştir. Pugliese ve ark. (2014) sıcaklık değişimlerinin 0-40°C arasında, günlük ortalama güneş ışığı periyodunun 8-10 saat olduğu güney Sicilya'da, Al-Asadi (2012) ise sıcaklık değişimlerinin 0-50°C arasında, günlük ortalama güneş ışığı periyodunun 9-14 saat olduğu Bağdat çevresinde daha sık oküler ve perioküler tümörle karşılaşıldığını aktarmıştır. Anderson ve Badzioch (1991) sığırlarda solar radyasyon ve yassı hücreli kanser arasındaki bağlantı yönünden yaptıkları çalışmada hastalığın gelişiminde solar radyasyonun önemli bir role sahip olduğunu ve gözdeki pigmentasyonun UV radyasyonun zararlı etkilerinden korunmada önemli olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmamızı oluşturan sütçü sığırların tamamının barındırıldığı Şanlıurfa ili deniz seviyesinden ortalama 550 m. yükseklikte, 37.1608 enlem ve 38.7863 boylamda bulunmaktadır. Şanlıurfa ilinin yaz ve sonbahar aylarında kuru ve sıcak hava, kışları ise nispeten soğuk hava şeklindeki çevresel koşulları ile ortalama 327 güneşli gün sayısı ve günlük ortalama 8.3 saat güneş ışığı alması (Anonim2016a, b), yazarların belirttiği coğrafi şartlara yakınlığı nedeniyle oküler ve perioküler tümörlere predispozisyon yaratmaktadır.

Sığırlarda oküler ve perioküler bölgede tümör lokalizasyonu açısından en çok etkilenen anatomik bölgeler sırasıyla Martins ve Barros (2014) gözkapakları, kornea ve 3. göz kapağı, Gharagozlu ve ark. (2007) membrana niktians ile palpebral konjunktiva, Pugliese ve ark. (2014) ise bulbar konjunktiva, kornea ve limbus kısımlarıdır. Çalışmamızda en sık olarak 3. göz kapağı ve alt/üst palpebral konjunktivada lokalize olan tümörler Martins ve Barros (2014) tarafından bildirilen sonuçlarla uyum sağlamaktadır. Yassı hücreli kanser genellikle lokal radyoterapi veya cerrahi müdahalenin kriyoterapi veya radyoterapiyle birlikte kullanılmasıyla tedavi edilebilir (Crispin, 2005). Hirsbrunner ve ark (1998) tarafından yapılan araştırmada 21 sığırın 17'sinde bulbus

ektirpasyonu, 2'sinde kriyosürji uygulandığı diğer 2'sinde ise ekonomik nedenlerden dolayı tedavi edilmeyerek kesime sevk edildiği bildirilmiştir. Operasyondan sonraki ortalama yaşam süresinin 15 ay olduğu ve hayvanın verim süresini uzatmak için yassı hücreli kanserde bulbus ektirpasyonunu önermektedirler. Sloss ve ark. (1986) tarafından Hereford ırkında yassı hücreli kanserin kontrolüyle ilgili incelenen 3 sürüde 3 mm çaptan daha büyük yassı hücreli kanser lezyonlarının kriyosürji ile tedavi edildiği, bir veya iki uygulama yapıldıktan sonra lezyonların %71'inin regrese olduğunu bildirmiştir. Tarafımızdan yapılan çalışmada 4 vakada lokal tümör eksizyonu ve 4 vakada göz enüklasyonu uygulandı. Postoperatif 6 ay süreyle yapılan takiplerde herhangi bir komplikasyonla karşılaşılmadı.

Sonuç olarak; sığırlarda gelişen oküler ve perioküler tümörlerin en sık karşılaşılanı olan yassı hücreli kanser simental ırkından başka ırklarda da görülebilir. Oküler ve perioküler tümörlerin tedavisinde eksizyon ve enüklasyon maliyeti düşük, basit ve az ekipmanla kolay uygulanabilir cerrahi yöntemlerdir. Oküler ve perioküler bölgedeki ileri tümöral hastalıklarda ağrıyı azaltmak, hayvanın yaşam kalitesini yükseltmek, ekonomik kayıpları azaltmak ve verim süresini arttırmak amacıyla kullanılabilir.

## Kaynaklar

- Al-Asadi RN, 2012: A survey and treatment of ocular carcinomas in Iraqi dairy cows from (1987-2012). *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences*, 3, 2, 66-77.
- Anderson DE, Badzioch M, 1991: Association between solar radiation and ocular squamous cell carcinoma in cattle. *Am J Vet Res*, 52, 5, 784-788.
- Anonim, 2016b: T.C. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, Yenilenebilir Enerji Genel Müdürlüğü, Güneş Enerjisi Potansiyel Atlası (GEPA), <http://www.eie.gov.tr/MyCalculator/pages/63.aspx>, Erişim tarihi; 25.11.2016
- Canpolat I, Yaman I, Gunay C, 2007: A case of primary intraocular malignant iris melanoma in an Akkaraman sheep. *Revue Med Vet*, 158, 4, 171-173.
- Ceylan C, Ozyıldız Z, Yılmaz R, Biricik HS, 2012: Clinical and histopathological evaluation of bovine ocular and periocular neoplasms in 15 cases in Sanliurfa region. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18, 3, 469-474.
- Crispin S, 2005: Farm Animal Ophtalmology. In "Notes on Veterinary Ophtalmology", First Ed, Blackwell Science Ltd, Oxford, pp. 239-264.
- Den Otter W, Hill FW, Klein WR, Everse LA, Ruitenberg EJ, Van der Ven LT, Koten JW, Steerenberg PA, Faber JA, Rutten VP, 1995: Ocular squamous cell carcinoma in Simmental cattle in Zimbabwe. *Am J Vet Res*, 56, 11, 1440-1444.

- Dubielzig RR, 2002: Tumors of the eye. In "Tumors in Domestic Animals", Ed; Meuten DJ, Fourth Ed. Iowa State Press, Iowa USA, pp 739-754.
- Gelatt KN, 2005: Neoplasia of the eye and associated structures. Eye and ear. In "The Merck Veterinary Manual", Ed; Kahn CM, Ninth Ed, Merck&Co., Inc, Philadelphia, pp. 413-416.
- Gharagozlou MJ, Hekmati P, Ashrafihelan J, 2007: A clinical and histopathological study of ocular neoplasms in dairy cattle. *Vet Arhiv*, 77, 5, 409-426.
- Hirsbrunner G, Ebeid M, Eicher R, 1998: Cancer eye in cattle: 21 cases (1990-1996). *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 140, 4, 149-155.
- Martins TB, Barros CSL, 2014: Fifty years in the blink of an eye: a retrospective study of ocular and periocular lesions in domestic animals. *Pesq Vet Bras*, 34, 12, 1215-1222.
- Ozmen O, Sirin Sengöz O, Çınar H, Dolu H, 2016: Retrobulbar fibrosarcoma in a sheep. *Acta Veterinaria-Beograd*, 66, 2, 265-270.
- Pugliese M, Mazzullo G, Niutta PP, Passantino A, 2014: Bovine ocular squamous cellular carcinoma: A report of cases from the Caltagirone area, Italy. *Vet Arhiv*, 84, 5, 449-457.
- Robert SM, 2002: Ocular neoplasia. In "Large Animal Internal Medicine", Ed; Smith BP, Third Ed, Mosby Inc, Missouri, pp. 1192-1199.
- Sabri MA, Shahzad M, Quayyum A, 2010: Ocular melanoma in a buffalo: A clinical case recorded under field conditions. *Buffalo Bulletin*, 29, 3, 235-237.
- Sağlıyan A, Günay C, Han MC, Özkaraca M, 2010: Sığırlarda oküler yassı hücreli karsinom olgusu: iki olgu. XII. Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi Özet Kitabı, Antalya.
- Schulz KL, Anderson DE, 2010: Bovine Enuclation: A retrospective study of 53 cases (1998-2006). *Can Vet J*, 51, 611-614.
- Shaw-Edwards R, 2010: Surgical treatment of the eye in farm animals. *Vet Clin Food Anim*, 26, 459-476.
- Sloss V, Smith T J S, Gao De Yi, 1986: Controlling ocular squamous cell carcinoma in hereford cattle. *Australian Veterinary Journal*, 63, 8, 248-251.
- Tsujita H, Plummer CE, 2010: Bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Clin Food Anim*, 26, 511-529.
- Weaver AD, Jean G, Steiner A, 2005: Bovine Surgery and Lameness. Second Ed., Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Wilcock BP, 1993: The eye and ear. In "Pathology of Domestic Animals", Eds; Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N, Fourth Ed, Academic Press, San Diego, pp.512-515.

**\*Yazışma Adresi:** Ünal YAVUZ

Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi,  
Cerrahi Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: unalyavuz@harran.edu.tr

## Koç Spermasının Dondurulmasında Bireysel Farklılıkların Etkisi

Çiğdem ÇEBİ ŞEN<sup>1\*</sup>, Recai KULAKSIZ<sup>2</sup>, Ali DAŞKIN<sup>3</sup>, Ergun AKÇAY<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

<sup>2</sup>Balıkesir Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Balıkesir, Türkiye.

<sup>3</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye.

Geliş Tarihi: 15.02.2017

Kabul Tarihi: 20.04.2017

**Özet:** Bu çalışma, koç spermasının dondurulmasında bireysel farklılıkları ortaya koymak ve bu farklılık üzerine sulandırıcı etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Ejakulatlar 5 Karayaka koçundan sezon içi dönemde suni vajina yardımıyla haftada bir kez alındı. Sperma örnekleri bireysel olarak 4 farklı sperma sulandırıcısı (Yağsız süt tozu, Tris, Andromed, Bioxcell) ile sulandırıldı. Sulandırılmış sperma örneklerini içeren payetler +4 °C'de 2 saat süreyle ekilibre edildikten sonra sıvı azot buharında (-120 °C) 15 dakika süreyle donduruldu ve sıvı azot (-196 °C) içinde saklandı. Tüm gruplardaki payetler 37 °C'de 30 saniye süreyle çözündürüldü. Her bir koça ait çözündürülmüş sperma örneklerinde spermatozoa motilitesi (%), canlı spermatozoa (%) ve anormal spermatozoa (%) yönünden değerlendirildi. Yağsız süt tozu sulandırıcısı ile dondurulan sperma örneklerinde çözüm sonu daha yüksek motilite elde edilirken, en düşük motilite oranı Bioxcell sulandırıcısından elde edilmiştir. Sonuç olarak, sunulan çalışmada elde edilen in vitro sperma kalitesi bulgularına göre yağsız süt tozu sulandırıcısının diğer sulandırıcılardan daha üstün olduğu ve koçlar arası bireysel farkı azalttığı bulunmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Bireysellik, Koç, Sperma, Sulandırıcılar.

### Response to Different Semen Extenders of Individual Ram Semen

**Abstract:** This study was conducted to evaluate individual differences in freezing ram sperm and to determine the extenders and individual sperm interaction. The ejaculates were collected from 5 Karayaka rams by artificial vagina twice a week during the breeding season. The each ejaculate was split into 4 equal aliquots and diluted with skimmed milk, Tris, Andromed and Bioxcell extenders. Straws contained semen was equilibrated at +4 °C for 2 h and than frozen in vapor of (15 min at -120 °C) liquid nitrogen and stored in liquid nitrogen. Frozen semen was thawed in a water bath at 37 °C for 30 seconds. In thawed semen, percentages of spermatozoa motility, viability, and abnormal spermatozoa, for each ejaculate were determined. The post-thaw sperm motility was significantly higher in skimmed milk extender post-thaw, while lowest motility rate was obtained from Bioxcell diluent. Consequently, it was found that skimmed milk extender was better than the other extenders and decreased individual differences between rams.

**Keywords:** Extenders, Individuality, Ram, Semen.

### Giriş

Karayaka koyunu, Karadeniz bölgesinde yetiştirilen ve yerli koyun ırkı içinde yer alan yağsız uzun kuyruklu bir ırktır. Koyun ırkları arasında en düşük süt verimine sahip ırk olmasına rağmen et kalitesi oldukça iyidir. Türkiye'de Karayaka ırkının popülasyon büyüklüğü hakkında bilgilerimiz tahminden öteye gitmemektedir. Şimdilik yok olma riski taşımayan bu ırkın yakından izlenmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Koyunculuk endüstrisinde, gerek ülkemizde gerekse dünyada dondurulmuş koç spermasıyla rutin olarak koyunlarda suni tohumlama yapılmamaktadır. Bunun çeşitli nedenleri olmakla birlikte en önemli nedenlerinden birisi olarak henüz dondurulmuş koç sperması ile suni tohumlama uygulamalarından tatminkar gebelik sonucu elde edilememiş olmasıdır (O'Hara ve ark., 2010). Genel olarak koç spermasının dondurulmasına yönelik yoğun araştırmalar yapıyor olmasına rağmen koç spermasının başarılı bir şekilde dondurulması her zaman mümkün değildir. Koç sperması dondurma-çözündürme sürecin-

de yüksek oranda motilite kaybına ve akrozomal hasara uğramaktadır (Watson, 1995). Koyunlarda donmuş sperma ile suni tohumlama uygulamalarının yapılabilmesi için ön koşul spermanın optimal şekilde dondurulmasıdır (Roca ve ark., 2006). Koç spermasının dondurulmasında tıpkı diğer türlerde olduğu gibi sodyum sitrat, yağsız süt tozu ve tris bazlı sulandırıcılar kullanılmakla birlikte (Holt, 2000), son zamanlarda boğa spermasının dondurulması için geliştirilmiş bazı ticari sperma sulandırıcıları koç spermasının dondurulmasında kullanılmış ve sulandırıcı olarak kullanılabileceğini bildiren araştırmacılar vardır (Kulaksız ve Daşkın, 2007). Yine aynı araştırmacılar, yumurta sarısındaki bireysel, irksal ve türsel farklılıklardan dolayı ve ayrıca süt gibi hayvansal orjinli sperma sulandırıcılarının spermanın mikrobiyel kontaminasyonunda risk taşıdığından Andromed ve Bioxcell gibi sentetik sperma sulandırıcılarının kullanılması gerektiğini savunmaktadırlar (Lopez ve ark., 2000; Smith ve ark., 1993). Koç spermasının dondurulmasında

kullanılan sulandırıcılarla yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar bireysel farklılıktan dolayı geniş bir varyasyon gösterebilmektedir (Barbas ve Mascarenhas, 2009). Ayrıca çözüm sonu bireysel farklılık üzerine kullanılan sulandırıcılar ile sperma örneklerinin etkileşime girmesi spermanın kompozisyonunu büyük ölçüde değiştirerek spermanın dondurulması üzerine olumsuz etki yapabilir. Geniş bireysel farklılıktan dolayı dondurma ve çözündürme prosedürü teknolojisi hala optimal değildir. Bu yüzden koyunculuk sektöründe dondurulmuş çözdürülmüş sperma örnekleri ile suni tohumlama uygulamalarındaki istikrarlı bir gelişme için, dondurulmuş-çözdürülmüş sperma örneklerinin kalitesini artırmak ve koçlar arasındaki bireysel değişkenliği en aza indirecek dondurma prosedürü geliştirmek gereklidir. Bu yüzden çalışmada koç spermasının dondurulabilirliğinde bireysel ve sulandırıcıların etkileri araştırılmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmanın hayvan materyalini 2 yaş ve üzerindeki 5 adet Karayaka ırkı koç oluşturdu. Araştırma sırasında kullanılan koçların bakım ve barındırılması koyun padoklarında standart yetiştirme koşullarında yapıldı. Ejakulatlar sperma dondurma denemelerinde (yağsız süt tozu sulandırıcı ile) çözüm sonrası progressive motilitesi en az %35 olan ve fertilitesi yüksek olarak bilinen koçlardan sun'i vajina yöntemiyle haftada iki kez alınmıştır. Nativ motilitesi %80 ve üzerinde olan koçların sperması kullanıldı. Her bir koçtan 10'ar ejakulat olmak üzere toplamda 50 ejakulat alındı. Her koçtan elde edilen her bir ejakulat 4 eşit kısma ayrılarak %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris, süt tozu ve yumurta sarısı içermeyen Andromed ve Bioxcell sulandırıcısı ile bir tohumlama dozunda (0,25ml)  $100 \times 10^6$  motil spermatozoa bulunacak şekilde sulandırılarak dozlandı. Spermanın dondurulması için 4 farklı sperma sulandırıcısı kullanıldı.

### Sulandırıcı Kompozisyonları:

**Sulandırıcı T:** %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren Tris bazlı sperma sulandırıcısı (3.63 g Tris, 0.5 g fruktoz, 1.99 g sitrik asit, 100 ml distile su).

**Sulandırıcı S:** %10 yumurta sarısı ve %5 gliserol içeren yağsız süt tozu sulandırıcısı (9 gr yağsız süt tozu, 0.9 g glukoz, 100 ml distile su).

**Sulandırıcı A:** Andromed® sulandırıcısı (Minitub, Tiefenbach, Germany)

**Sulandırıcı B:** Bioxcell® sulandırıcısı (IMV technologies, L'Aigle, Franse).

**Spermanın Dondurulması:** Sulandırmayı takiben spermalar 0.25 ml'lik payetlere çekildi ve +4 °C'de 2 saat ekilibrasyona bırakıldı. Ekilibrasyondan sonra payetler sıvı azot seviyesinin 4 cm üzerinde (-120°C) sıvı azot buharında 15 dakikada donduruldu ve sıvı azota daldırılarak saklandı. Dondurulmuş spermalar araştırma tamamlandıktan sonra spermatozoa motilitesi, canlılık, anormal spermatozoa oranı yönüyle değerlendirildi.

### Çözüm Sonrası Spermatolojik Değerlendirmeler:

Dondurulmuş payetler 37 °C'de 30 saniye süreyle çözdürüldükten sonra 5µl sperma lam üzerine alınarak üzerine lamel kapatıldı ve spermatozoa motilitesi 37 °C'de ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta X40'lık büyütmede en az 5 değişik mikroskop sahasında incelendi. Bulunan ortalama değer yüzde (%) olarak değerlendirildi. Çözdürülmüş spermalardaki canlı spermatozoa oranı supravital boyama tekniğiyle belirlendi. Eosin-nigrosin boyası kullanılarak hazırlanan frotilerde mikroskop yardımıyla X40 büyütmede en az 200 hücre sayılarak canlı spermatozoa oranı yüzde (%) olarak ifade edildi. Preparatların değerlendirilmesinde baş kısmı tam boya alan spermatozoonlar ölü, yarı boya alanlar ve hiç boya almayan spermatozoonlar ise canlı olarak değerlendirildi. Sperma numunelerindeki anormal spermatozoa oranı ise sıvı fizyasyon yöntemiyle belirlendi. Hancock solüsyonu kullanılarak fikze edilen hücreler lam-lamel arasında bir faz-kontrast mikroskop altında incelendi. İmmersiyon objektif (x100 büyütme) altında en az 200 spermatozoonun çeşitli kısımlarının (akrozom, baş, orta kısım ve kuyruk) incelenmesi sonunda anormal yapı gösteren spermatozoa oranı yüzde (%) olarak belirlendi.

**İstatistik Analiz:** Verilerin normallik varsayımlarını karşılayıp karşılamadığı Shapiro-Wilk testi ile, varyansların homojenliği Levene's testi ile değerlendirildi. Normal dağılmayan verilere logaritmik transformasyon uygulandı. Koçların bireysel farklılıkları ve sulandırıcıların etkisini belirlemek için iki yönlü varyans analizi yapıldı. Koç ile sulandırıcı arasında interaksiyon anlamlı olduğunda GLM (General Lineer Model) prosedürleri kapsamında SPSS (16.0) paket programının syntax menüsüne manuel olarak ayrı bir kodlama yazılarak bu interaksiyon değerlendirildi.  $P < 0.05$  düzeyi anlamlı olarak kabul edildi. Sonuçlar ortalama  $\pm$  standart hata olarak verildi.

## Bulgular

Yağsız süt tozu, Tris, Andromed ve Bioxcell sulandırıcısıyla bireysel olarak dondurulmuş koç spermasında çözüm sonu başlıca spermatolojik

özellikler Tablo 1, 2 ve 3'te verilmiştir. Koç ve sulandırıcı etkileşiminde; spermatozoa motilitesi, canlı spermatozoa oranı ve normal spermatozoa üzerine etkisine bakıldığı zaman, yağsız süt sulandırıcısı ile dondurulan sperma örneklerinde çözüm sonu daha yüksek motilite elde edilirken, en düşük motilite oranı Bioxcell sulandırıcısından elde edilmiştir. Koç ve farklı sulandırıcı interaksyonunun spermatolojik özellikler üzerine etkisi Tablo 1, 2 ve 3'te gösterilmiştir. Koçlar arasındaki bireysel dondurulmaya bakıldığında ise koçlar arasında

istatiki bir fark elde edilmiştir. Sütlü sulandırıcı ile sperması en iyi donan 2 numaralı koç iken, en kötü donan 4 ve 5 numaralı koçun sperması olmuştur. Tris sulandırıcısı ile en iyi sperması donan 2 numaralı koç iken, Andromed sulandırıcısı ile en iyi donan koç sperması 2-3 numaralı koçtur ve diğer koçlar arasında koç ve sulandırıcı interaksyonu bakımından fark elde edilmemiştir. Bioxcell sulandırıcısı ile en iyi donan 2 numaralı koç iken en kötü 4 ve 5 numaralı koç olmuştur.

**Tablo 1.** Farklı sulandırıcılar ile dondurulan koç spermasının motilite değerleri

	Yağsız süt tozu	Tris	Andromed	Bioxcell	Koç	Sulandırıcı	Etkileşim
<b>Koç 1</b>	45.83±4.92 <sup>a,B,C</sup>	29.173±4.76 <sup>b,B</sup>	22.50±4.18 <sup>b,B</sup>	20.83±4.92 <sup>b,B,C</sup>			
<b>Koç 2</b>	67.50±2.74 <sup>a,A</sup>	60.00±5.48 <sup>a,A</sup>	55.00±3.16 <sup>b,A</sup>	43.33±2.58 <sup>c,A</sup>			
<b>Koç 3</b>	53.33±2.58 <sup>a,C</sup>	33.33±2.58 <sup>b,B</sup>	47.50±6.89 <sup>a,A</sup>	25.83±5.85 <sup>b,C</sup>			
<b>Koç 4</b>	38.33±5.16 <sup>a,B</sup>	30.83±6.65 <sup>a,B</sup>	21.67±4.08 <sup>b,B</sup>	14.17±3.76 <sup>b,B</sup>	P<0.001	P<0.001	P<0.001
<b>Koç 5</b>	45.00±4.47 <sup>a,B</sup>	26.67±5.16 <sup>b,B</sup>	27.50±5.24 <sup>b,B</sup>	14.17±4.92 <sup>c,B</sup>			

<sup>a,b,c</sup>; her satırdaki, <sup>A,B,C</sup>; her sütündeki farklı üst karakterler istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

**Tablo 2.** Koç ve sulandırıcı interaksyonunun canlı spermatozoa oranı üzerine etkisi

	Yağsız süt tozu	Tris	Andromed	Bioxcell	Koç	Sulandırıcı	Etkileşim
<b>Koç 1</b>	50.00±2.4 <sup>a,B</sup>	43.50±4.0 <sup>a,C</sup>	34.83±4.5 <sup>b,B</sup>	30.50±3.2 <sup>b,B,C</sup>			
<b>Koç 2</b>	73.33±2.0 <sup>a,A</sup>	70.17±4.4 <sup>a,A</sup>	64.83±5.6 <sup>b,A</sup>	53.67±2.5 <sup>c,A</sup>			
<b>Koç 3</b>	60.17±3.6 <sup>a,C</sup>	43.50±4.5 <sup>b,C</sup>	56.50±4.0 <sup>a,A</sup>	36.33±4.8 <sup>b,C</sup>	P<0.001	P<0.001	P<0.001
<b>Koç 4</b>	43.50±3.5 <sup>a,B</sup>	39.67±5.2 <sup>a,B,C</sup>	28.00±4.4 <sup>b,B</sup>	19.67±3.3 <sup>b,B</sup>			
<b>Koç 5</b>	49.50±1.7 <sup>a,B</sup>	33.00±3.9 <sup>b,B</sup>	30.33±5.0 <sup>b,B</sup>	19.83±4.0 <sup>c,B</sup>			

<sup>a,b,c</sup>; her satırdaki, <sup>A,B,C</sup>; her sütündeki farklı üst karakterler istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

**Tablo 3.** Koç ve Sulandırıcı interaksyonunun normal spermatozoa oranı üzerine etkisi

	Yağsız süt tozu	Tris	Andromed	Bioxcell	Koç	Sulandırıcı	Etkileşim
<b>Koç 1</b>	63.50±5.43 <sup>B,D</sup>	60.17±6.97 <sup>B</sup>	57.33±5.99 <sup>A</sup>	59.83±6.24 <sup>A</sup>			
<b>Koç 2</b>	77.17±3.60 <sup>a,A</sup>	70.00±4.34 <sup>a,b,A</sup>	63.83±3.25 <sup>b,c,A</sup>	58.00±2.28 <sup>c,A</sup>			
<b>Koç 3</b>	63.00±5.87 <sup>a,D</sup>	51.67±5.28 <sup>b,C</sup>	63.50±6.09 <sup>a,A</sup>	52.33±4.69 <sup>b,A</sup>	P<0.001	P<0.001	P<0.001
<b>Koç 4</b>	52.33±4.59 <sup>a,C</sup>	52.00±5.97 <sup>a,C</sup>	48.50±5.43 <sup>a,B</sup>	40.33±3.98 <sup>b,B</sup>	1		
<b>Koç 5</b>	59.00±3.90 <sup>a,B,C,D</sup>	45.67±4.23 <sup>c,C</sup>	43.17±4.31 <sup>c,B</sup>	36.50±3.27 <sup>b,c,B</sup>			

<sup>a,b,c</sup>; her satırdaki, <sup>A,B,C</sup>; her sütündeki farklı üst karakterler istatistiksel olarak farklılığı ifade etmektedir.

## Tartışma ve Sonuç

Var olan çalışmada en yüksek çözüm sonu spermatozoa motilitesi yağsız süt tozu sulandırıcısı ile dondurulmuş spermalardan elde edilirken, en düşük spermatozoa motilitesi Bioxcell sulandırıcısı ile dondurulmuş sperma örneklerinden elde edilmiştir. Sulandırıcılar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmelerde çözüm sonu spermatozoa motilitesi, ölü spermatozoa oranı, anormal spermatozoa oranları yönüyle gruplar arasında kaydedilen farklılıklar önemli (P<0.001) bulundu (Tablo 1). Bu çalışmadaki bulguları destekler nitelikteki sonuçlar Lopez-Saez ve ark. (2000) ile Kulaksız ve ark. (2012) tarafından bildirilmiştir. Paulenz ve ark. (2000) ile Gündoğan (2009) ise süt bazlı sulandırıcı ile tris bazlı sulandırıcıyı karşılaştırdıklarında çözüm sonu spermatozoa motilitesi ve membran mütünlüğünü en yüksek tris

bazlı sulandırıcılar ile dondurulmuş spermalardan elde etmişlerdir. Lymberopoulos ve Khalifa (2010) donmuş spermanın potansiyel fertilizasyonunun korunmasında Bioxcellin Andromed'ten daha üstün rol oynadığını rapor ederlerken, Gil ve ark. (2003) ise Bioxcell'in koç spermasının dondurulmasında kullanılması sonucu elde edilen bulguların yağsız süt tozu sulandırıcısı bulgularından hiç bir farkı olmadığını bildirmişlerdir. Var olan çalışmada ise diğer sulandırıcılar ile karşılaştırıldığında Bioxcell sulandırıcısının çözüm sonu motilitenin sürdürülmesinde kriyoprotektif etkisinin daha az olduğu görüldü. Dorji ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada ise Bioxcell ve tris sulandırıcılarının çözüm sonu sperma kalitesi (motilite, membran bütünlüğü) üzerine etkileri bakımından herhangi bir farklılık bulamamışlardır. Var olan bu tutarsız



sonuçlar, kullanılan sperma sulandırıcılarının içeriğinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bilindiği gibi sulandırıcı kompozisyonu başarılı bir sperma dondurma işlemi için önemlidir (Salamon ve Maxwell 2000). Bioxcell sulandırıcısının antioksidanlarla güçlendirilmiş olması, yumurta sarısı bazlı sulandırıcılara göre bir avantaj değildir. Çünkü oksidatif strese karşı spermatozoanın korunmasında etkili olan fosfolipit, kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoproteinler yumurta sarısının doğal bileşeni olarak yumurtada bulunmaktadır. Ayrıca kullanılan sulandırıcılar ve teknikler benzer olduğundan dolayı ortaya çıkan farklılığı doğrudan çalışmanın yapıldığı, koçların bireysel özelliklerine veya araştırmacılara bağlamak mümkün olabilir. Koç sperması soğuk şokuna karşı çok hassastır ve spermanın dondurulabilirliğinde bireysel farklılıklar var olabilir. Bu çalışmada da koç spermasının dondurulabilirliğinde bireysel farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu farklılık o kadar geniş ki, koçların dondurulabilirliği iyi ya da dondurulabilirliği kötü olarak sınıflandırılmasına izin vermektedir (Medrano ve ark., 2002). Spermanın donma ve çözüm sonu tolerasındaki bireysel farklılık daha önceden birçok hayvan türünde rapor edildiğinden dolayı bu farklılığın koçlarda var olması sürpriz değildir. (Ros-Santaella ve ark., 2014). Roca (2006) tarafından dondurulmuş spermanın canlılığındaki farkı açıklayan faktörün bireysel fark olduğu belirtilmiştir. Donma ve çözdürmeye karşı spermatozoanın duyarlılığındaki bireysel fark genetik orjinli olabilir (Ros-Santaella ve ark., 2014). Thurston ve ark. (2002) ile Fraser ve ark. (2008) tarafından dondurulabilirliği kötü olarak ve dondurulabilirliği iyi olarak sınıflandırılan bireyler arasındaki kriyopreservasyona bağlı yaralanmaların ve motilitedeki değişikliğin temelinde genetik faktörün var olduğu belirtilmiştir. Kriyopreservasyona bağlı meydana gelen yaralanmalarla ilişkili genetik faktörlerin altında yatan mekanizma tam olarak anlaşılamazken, bu durum koç sperması ile sperma sulandırıcısı içeriğinin etkileşimini sonucu meydana gelebilir. Plante ve ark. (2015) tarafından ejakulasyonda spermaya eklenen Bağlayıcı spermatozoa protein (BSP)'lerinin sığırlarda süt proteinleriyle etkileşime girdiğini ve süt bazlı sulandırıcılar kullanılmasıyla meydana gelen bu etkileşiminin de spermanın dondurulmasında olumlu etkili yapacağını bildirmişlerdir. BSP proteinlerinin, kolesterol ve fosfolipidleri spermatozoa membranından uzaklaştırarak spermanın kompozisyonunun değişmesi ile spermatozoonlar üzerine zararlı etki gösterdiği bildirilmiştir. Plante ve ark. (2015) tarafından BSP proteinleri ile yumurta sarısında bulunan düşük yoğunluklu lipoproteinlerin etkileşimi sonucu sperm membranlarından kolesterol ve fosfolipit ekstraksiyonunun önlenmesi ve bu yüzden prezervasyon süresince yumurta

sarisının spermatozoayı koruduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca süttten izole edilen kazein taneciklerinin spermatozoa membranları için zararlı etkiye sahip olan BSP proteinleri ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. (Plante ve ark., 2015). Daha sonra sığırlarda yapılan bir çalışmada ise BSP proteinlerinin kazein tanecikleri, alfa laktaalbumin ve beta laktoglobulin gibi birçok süt proteinini bağladığı bildirilmiştir. BSP proteinlerinin homologları bizon, teke, aygır, domuz ve koç gibi birçok türde izole edilmiştir. Var olan çalışmada da sulandırıcı kompozisyonu ile koç arasında bir etkileşimin var olduğu ve koç spermasının dondurulmasında bireysel farklılıklar üzerine süt proteinleri ve yumurta sarısının koruyucu etki yaptığı saptanmıştır.

Sonuç olarak, dondurma ve çözdürme prosedürleri spermatozoanın canlılığında geniş bir bireysel çeşitliliğe neden olacağından bu teknoloji hala suboptimal olarak dikkate alınmaktadır. Optimize dondurma protokolü bireysel çeşitliliğin azaltılmasına yardımcı olabilir. Süt bazlı sulandırıcılar çözüm sonu sperma kalitesini artırmakta ve koçlar arası bireysel farkı azaltmaktadır. Bu yüzden süt bazlı sulandırıcılar sulandırıcı bireysel koç spermasının dondurulmasında dondurma öncesi bir referans sulandırıcı olarak kullanılabilir.

## Kaynaklar

- Barbas JP, Mascarenhas RD, 2009: Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell Tissue Bank*, 10, 49-62.
- Dorji P, Pattarajinda V, Vongprolud V, 2014: Cryopreservation of semen of mithun and siri bulls. *Bangl J Vet Med*, 12, 147-153.
- Fraser L, Chandra SP, Strzeżek J, 2008: Identification of amplified fragment length polymorphism markers associated with freezability of boar semen—a preliminary study. *Med Weter*, 64, 646-649.
- Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Soderquist L, Rodriguez-Martinez H, 2003: Fertility of ram semen frozen in Bioxcell and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, 59, 1157-1170.
- Gündoğan M, 2009: Short term preservation of ram semen with different extenders. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 429-435.
- Holt WV, 2000: Fundamental aspects on sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.
- Kulaksız R, Daşkın A, 2007: Teke spermasının kısa ve uzun süreli saklanması. *Vet Hek Dern Derg*, 78, 4, 51-56.
- Kulaksız R, Çebi Ç, Akçay E, 2012: The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4 °C. *Turk J Vet Anim Sci*, 36, 177-182.
- Lopez-Saez A, Ortiz N, Gallego L, Gadre JJ, 2000: Liquid storage (5 °C) of ram semen in different diluents. *Arch Androl*, 44, 155-164.

- Medrano A, Watson PF, Holt WV, 2002: Importance of cooling rate and animal variability for boar sperm cryopreservation: insights from the cryomicroscope. *Reproduction*, 123, 315-322.
- Lymberopoulos AG, Khalifa TA, 2010: Sperm chromatin stability during in vitro manipulation of beef bull semen. *Reprod Domest Anim*, 45, 2, 307-314.
- O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans AC, Lonergan P: 2010: Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, 73, 4, 541-549.
- Paulenz H, Kommisrud E, Hofmo PO, 2000: Effect of long-term storage at different temperatures on the quality of liquid boar semen. *Reprod Domest Anim*, 35, 83-87.
- Plante G, Luisgnan MF, Lafleur M, Manjunath P, 2015: Intraction of milk proteins and Binder of Sperm (BSP) Proteins from boar, stallion and ram semen. *Reprod Biol and Endocrin*, 13, 1-13.
- Roca J, Hernandez M, Carvajal G, Vazquez JM, Martinez EA, 2006: Factors influencing boar sperm cryosurvival. *J Anim Sci*, 84, 2692-2699.
- Ros-Santaella JL, Dominguez-Rebolledo AE, Grade JJ, 2014: Sperm flagellum volume vetermines freezability in Red Deer spermatozoa. *PLOS ONE*, 9, 11, 1-11.
- Smith JF, Asher GW, Briggs RM, Morrow CJ, Murray GR, Oliver JE, Parr J, Veldhuizen FA, Upreti GC, 1993: Effect of diluent and storage time on pregnancy rate in ewes after intrauterine insemination. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, 53, 295-298.
- Salamon S, Maxwell WM (2000): Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, 62, 77-111.
- Thurston LM, Siggins K, Mileham AJ, Watson PF, Holt WV, 2002: Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol Reprod*, 66, 545-554.
- Watson PF, 1995: Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev*, 7, 871-891.

**\*Yazışma Adresi:** Çiğdem Çebi ŞEN

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı,  
Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: cigdemcebi@hotmail.com

## Effect of Adding Different Levels of Dried Molasses Sugar Beet Pulp on the Silage Quality and *In Vitro* Digestibility of Wet Tomato Pomace Silage\*\*

Halim Gökhan SARGIN<sup>1\*</sup>, Nihat DENEK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ministry of Food, Agriculture and Livestock, Buyukorhan, Bursa, Turkey.

<sup>2</sup>Faculty of Veterinary, Department of Animal Science, Harran University, Sanliurfa, Turkey.

Received Date: 16.02.2017

Accepted Date: 17.04.2017

**Abstract:** This study was aimed to investigate the effects of supplementation of dried molasses sugar beet pulp (3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20% and 25%, fresh material basis) on the silage quality, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) and metabolisable energy (ME) content of wet tomato pomace (WTP) silage. All the treatments consisted of five replicate silos, and they were prepared in 1.5 L glass jar silos. The ensiling of WTP with dried molasses sugar beet pulp including molasses (DMSBP) had a significant effect on the chemical composition, ME and IVOMD of silages. Dry matter, crude ash, ME and IVOMD values of silages were increased with supplementation of DMSBP levels ( $P<0.001$ ). Crude protein (CP), acid detergent fiber (ADF), neutral detergent fiber (NDF) contents of silages were decreased with increasing level of DMSBP ( $P<0.001$ ). Ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) and lactic acid contents were decreased with increasing level of DMSBP ( $P<0.001$ ). Propionic acid contents of silages were increased with increasing level of DMSBP ( $P<0.001$ ). Butyric acid was not detected in any silage groups. As a result, tomato pomace can be ensiled with DMSBP without decreasing the quality criteria of silage.

**Keywords:** Dried molasses sugar beet pulp, Silage, Wet tomato pomace.

### Yaş Domates Posasına Farklı Düzeylerde Melaslı Kuru Şeker Pancarı Posası İlavesinin Silaj Kalitesi ile *In Vitro* Sindirim Üzerine Etkisinin Araştırılması

**Özet:** Bu çalışmanın amacı; melaslı kuru şeker pancarı posasının (MKŞPP) (%3, %5, %7, %10, %15, %20 ve %25) yaş domates posasına ilavesinin oluşacak silaj kalitesine, *in vitro* organik madde sindirimine (İVOMS) ve metabolik enerji (ME) değerine etkisini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Çalışmada değerlendirilen silajlar 1.5 L cam kavanozlarda ağızları hava almayacak şekilde beşer tekerrür halinde silolanmışlardır. Melaslı kuru şeker pancarı posası ile domates posasının silolanması oluşan silajların kompozisyonu, *in vitro* organik madde sindirim derecesini ve metabolik enerji değerini önemli derecede etkilemiştir. Domates posasına MKŞPP ilave seviyesinin artışına bağlı olarak elde edilen silajların kuru madde (KM), ham kül (HK), metabolik enerji (ME) ve İVOMS değerleri artarken ( $P<0.001$ ), ham protein (HP), asit deterjanda çözünmeyen lif (ADF) ve asit deterjanda çözünmeyen lif (NDF) değerleri azalmıştır ( $P<0.001$ ). Domates posasına MKŞPP ilavesinin artışına bağlı olarak silaj pH değerlerinde genel olarak belirgin bir farklılık görülmezken, silaj amonyak azotu ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) ve laktik asit değerlerinin azaldığı ( $P<0.001$ ), propiyonik asit değerlerinin ise arttığı ( $P<0.001$ ) görülmüştür. Bu çalışmada değerlendirilen silajlarda bütirik asit tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, yaş domates posasının melaslı kuru pancar posası ilavesi ile silolanabileceği ve elde edilen silajların kaliteli silaj niteliği taşıdıkları sonucuna varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Melaslı kuru şeker pancarı posası, Silaj, Yaş domates posası.

### Introduction

It is possible that apart from the planted forages, agricultural by products containing high water content and food industry by-products should be used as feedstuff to feed animals after drying or ensiling with various methods. These resources are also called alternative silage materials (FAO, 2013). It is possible to use sugar beet, tomato, pea and barley pulps for feeding animals with ensiling and indeed ensiling these resources is gradually becoming more common. As food industry by-products are products obtained seasonally, they have been used for a long time as a fresh roughage resource in family-type farms (Denek and Can, 2005). Tomato pomace consists of peel, seed and fibrous part remaining from

processing of tomatoes for sauce production. According to the data obtained in 2013, approximately 150-200 thousand tons of fresh tomato pomace was produced in Turkey (TUIK, 2014). Tomato pomace has a high water content of 75-85% thus it is not possible to preserve it without spoiling when it gets contact with the air for a long time. Various methods can be used to decrease dry matter rate such as adding adsorbents such as cereals or straws during ensilage to protect from spoilage and nutrient loss for long storage periods (Denek and Can, 2005). It is possible to ensile tomato pomace without additives; however high dry matter containing additives are added to prevent nutrient losses via excessive water drainage

during ensiling in addition to increment of silage fermentation quality.

Many researchers reported that dry matter values of fresh tomato pomace ranged from 14.2 to 26.04% (Caluya and Siar, 1995; Çapçı et al., 1995; Denek and Can, 2005; Hadjipanayiotou, 1994; Karabulut et al., 1999; Weiss et al., 1997). The differences between dry matter values may be derived from differences in applied methods and type processing of tomato pomace production (Denek and Can, 2005). Crude protein (CP) content of fresh tomato pomace were determined in range of 18.1 and 23.5% of DM (Denek and Can, 2005; Gasa et al., 1989; Hadjipanayiotou, 1994; Karabulut et al., 1999; Weiss et al., 1997). These CP variations of tomato pomace were attributed to differences in the amount of seeds rather than the amount of peels in the pomace (Bradowski and Geisman, 1980; Ensminger et al., 1990; Haşimoğlu et al., 1979). Mendez-Llorent et al. (2014) revealed that tomato pomace could be stored for a long time without spoilage and nutrient loss. They reported that the DM, ash, crude protein, ether extract, ADF and NDF values in the silages following 70 days ensilage period were 24.0%, 10.5%, 22.0%, 3.9%, 14.4% and 22.2%, respectively. Ventura et al. (2009) reported that metabolisable energy content of fresh tomato pomace was 2.59 Mcal/kg and no negative effect was observed up to 1.5 kg/day of the pomace given to goats. In contrast, Abbeddou et al. (2015) indicated that inclusion of tomato at the rate of 30% to the sheep ration during lactation period decreased milk yield and milk protein content whereas unsaturated fatty acid and total fat content of the milk increased with pomace addition.

This study was aimed to investigate the effects of supplementation of dried molasses sugar beet pulp (3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20% and 25%) on the silage quality, *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) and metabolisable energy (ME) content of wet tomato pomace (WTP) silage.

## Material and Methods

Wet tomato pomace (WTP) material was obtained from private tomato paste factory in Bursa city, dried molasses sugar beet pulp (DMSBP) as a silage additive was provided from Balıkesir-Bursa Beetroot Cooperative. Wet tomato pomace, DMSBP and the silage samples were dried and grounded through 1 mm screen in laboratory mill (Wiley mill) for subsequent analysis. Dry matter (DM), ash and crude protein (CP) content of WTP, DMSBP and the

silage samples were analyzed by AOAC (2005). Neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) content of WTP, DMSBP and the silage samples were analyzed according to method described by Van Soest et al. (1991). Water soluble carbohydrate (WSC) content of silage material and silage additive were analyzed according to methods described by Dubois et al. (1956). Experimental silage treatments consisted of five replicates for each treatment, including control WTP silage and silages supplemented with DMSBP at the ratio of 3%, 5%, 7%, 10%, 15%, 20%, and 25% at fresh material basis. Silages were prepared in the 1.5 L glass jars. The jars were stored for 60 days at room temperature and were opened after 60 days of ensiling. The pH (Polan et al. 1998) values and dry matter (AOAC, 2005) contents of the silages were immediately measured. After pH determined, 10 ml filtrate was acidified with 0.1 ml 1 M HCl (v/v) and stored at -18 °C for silage ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) analysis. The NH<sub>3</sub>-N contents of the silage samples were analyzed according to the Kjeldahl method described by Broderick and Kang (1980). Other 10 ml filtrate was acidified with 0.25 ml of 25% metaphosphoric acid. Volatile fatty acids and lactic acid were determined by high-performance liquid chromatography according to the method reported by Suzuki and Lund (1980). The gas production values of the silages, WTP (as silage fresh material) and DMSBP (as silage additive) were determined through the method described by Menke and Steingass (1988) using four glass syringe replicates for each. The *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD, % OM) and metabolizable energy (ME) (MJ/kg DM) of silages were calculated using equations reported by Menke et al. (1979). Rumen fluid inoculum for the *in vitro* study was obtained from slaughtered animals. The data obtained in the current study was subjected to one-way analysis of variance using SPSS program (1991). Duncan multiple mean comparison test was used for determination the differences among treatment groups.

## Results

Chemical composition, ME, IVOMD and water soluble carbohydrates (WSC) of wet tomato pomace (WTP) and DMSBP are presented in Table 1. Effects of different levels of DMSBP on WTP silage nutrient composition are presented in Table 2. Effect of different levels of DMSBP on pH, ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) content and organic acids of WTP silages are presented in Table 3.

**Table 1.** Chemical composition, metabolisable energy, *In vitro* organic matter digestibility and water soluble carbohydrates of wet tomato pomace and dried molasses sugar beet pulp

Silage Material	DM	Ash	CP	ADF	NDF	IVOMS	ME	WSC
WTP	20.08	5.00	16.32	43.44	45.53	60.04	9.64	16.92
DMSBP	93.65	5.80	10.24	27.21	38.99	70.89	10.89	25.48

**WTP:** Wet tomato pomace; **DMSBP:** Dried molasses sugar beet pulp; **DM:** Dry matter, %; **Ash:** crude ash, % DM; **CP:** crude protein, % DM; **ADF:** Acid detergent fiber, % DM; **NDF:** Neutral detergent fiber, % DM; **IVOMD:** *In vitro* organic matter digestibility, % OM; **ME:** Metabolisable energy, MJ/kg DM; **WSC:** Water soluble carbohydrates, % DM.

**Table 2.** Effect of dried molasses sugar beet pulp on wet tomato pomace silage composition and metabolisable energy and *in vitro* organic matter digestibility

Group	DM	Ash	CP	ADF	NDF	IVOMD	ME
Control	21.48 <sup>h</sup>	4.82 <sup>d</sup>	17.51 <sup>a</sup>	49.29 <sup>a</sup>	55.72 <sup>a</sup>	58.23 <sup>d</sup>	9.47 <sup>c</sup>
3% DMSBP	22.72 <sup>g</sup>	5.01 <sup>bc</sup>	17.43 <sup>a</sup>	45.76 <sup>b</sup>	53.73 <sup>b</sup>	59.83 <sup>cd</sup>	9.70 <sup>bc</sup>
5% DMSBP	24.23 <sup>f</sup>	5.01 <sup>bc</sup>	16.62 <sup>b</sup>	44.61 <sup>bc</sup>	53.01 <sup>bc</sup>	62.48 <sup>bc</sup>	10.04 <sup>ab</sup>
7% DMSBP	25.43 <sup>e</sup>	5.04 <sup>b</sup>	16.15 <sup>bc</sup>	43.63 <sup>cd</sup>	51.66 <sup>c</sup>	63.14 <sup>ab</sup>	10.10 <sup>ab</sup>
10% DMSBP	26.96 <sup>d</sup>	5.19 <sup>ab</sup>	15.40 <sup>c</sup>	42.18 <sup>de</sup>	51.86 <sup>c</sup>	62.67 <sup>abc</sup>	9.97 <sup>ab</sup>
15% DMSBP	29.69 <sup>c</sup>	5.27 <sup>a</sup>	14.54 <sup>d</sup>	42.11 <sup>de</sup>	52.69 <sup>bc</sup>	65.83 <sup>a</sup>	10.38 <sup>a</sup>
20% DMSBP	31.90 <sup>b</sup>	5.32 <sup>a</sup>	14.21 <sup>d</sup>	41.75 <sup>e</sup>	51.63 <sup>c</sup>	65.15 <sup>ab</sup>	10.26 <sup>a</sup>
25% DMSBP	35.10 <sup>a</sup>	5.33 <sup>a</sup>	14.11 <sup>d</sup>	40.85 <sup>e</sup>	51.73 <sup>c</sup>	65.22 <sup>ab</sup>	10.26 <sup>a</sup>
SEM	0.709	0.030	0.213	0.425	0.230	0.444	0.055
Significance	***	***	***	***	***	***	***

<sup>a-f</sup> Values in the same column without a common superscript letter are significantly different (P<0.001). **DMSBP:** Dried molasses sugar beet pulp; **DM:** dry matter, %; **Ash:** Crude ash, % DM; **CP:** Crude protein, % DM; **ADF:** Acid detergent fiber, % DM; **NDF:** Neutral detergent fiber, % DM; **IVOMD:** *In vitro* organic matter digestibility, % OM; **ME:** Metabolisable energy, MJ/kg DM; **\*\*\*:** P<0.001.

**Table 3.** Effect of different levels of dried molasses sugar beet pulp on pH, ammonia nitrogen content and organic acids of wet tomato pomace silages

Group	pH	NH <sub>3</sub> -N	LA	AA	PA	BA
Control	3.43 <sup>ab</sup>	6.31 <sup>a</sup>	51.25 <sup>a</sup>	16.87 <sup>bc</sup>	0.00 <sup>g</sup>	ND
3% DMSBP	3.45 <sup>a</sup>	6.36 <sup>a</sup>	49.08 <sup>a</sup>	20.38 <sup>a</sup>	0.00 <sup>g</sup>	ND
5% DMSBP	3.42 <sup>ab</sup>	6.19 <sup>ab</sup>	40.97 <sup>b</sup>	17.98 <sup>b</sup>	0.32 <sup>f</sup>	ND
7% DMSBP	3.40 <sup>b</sup>	6.09 <sup>abc</sup>	35.48 <sup>c</sup>	15.44 <sup>cd</sup>	0.57 <sup>e</sup>	ND
10% DMSBP	3.40 <sup>b</sup>	5.87 <sup>abc</sup>	32.08 <sup>c</sup>	15.89 <sup>bcd</sup>	0.73 <sup>d</sup>	ND
15% DMSBP	3.43 <sup>ab</sup>	5.74 <sup>abc</sup>	26.48 <sup>d</sup>	15.18 <sup>dcd</sup>	1.00 <sup>c</sup>	ND
20% DMSBP	3.42 <sup>ab</sup>	5.61 <sup>bc</sup>	24.10 <sup>de</sup>	15.14 <sup>dcd</sup>	1.19 <sup>b</sup>	ND
25% DMSBP	3.43 <sup>ab</sup>	5.49 <sup>c</sup>	22.52 <sup>f</sup>	14.35 <sup>d</sup>	1.35 <sup>a</sup>	ND
SEM	0.004	0.079	1.668	0.338	0.491	-
Significance	***	***	***	***	***	-

<sup>a-g</sup> Values in the same column without a common superscript letter are significantly different (P<0.001). **DMSBP:** Dried molasses sugar beet pulp; **pH:** pH value; **NH<sub>3</sub>-N:** Ammonia nitrogen, NH<sub>3</sub>-N/TN; **LA:** Lactic acid, g/kg KM; **AA:** Acetic acid, g/kg DM; **PA:** Propionic acid, g/kg DM; **BA:** Butyric acid, g/kg DM; **ND:** Not detected; **\*\*\*:** P<0.001.

## Discussion and Conclusion:

In this study, DM content of control silage (21.48%) was found higher than dry matter content of WTP (20.08%). This difference is thought to be caused by losses in the form of silo effluents. The DM values of the silages obtained from the our study was lower (23.04-34.64%) than the values obtained in other studies (Weiss et al., 1997; Di Blasi et al., 1997; Çapçı et al., 2002; Denek and Can, 2006; Mirzaei et al., 2008; Orosz et al., 2012; Mendez-Llorente et al., 2014; Wu et al., 2014). These differences in DM contents of tomato pomace may be associated with the differences in production technologies implemented during the process of producing tomato pomace (Denek and

Can, 2006). In the present study, the DM values of the silages increase with inclusion level of DMSBP addition, and the DM value of 25% DMSBP addition had highest DM content (35.10%) which is generally desirable DM value for high quality silages. The DM values of all the silages obtained in this study (21.48-%35.10%) were found closer to DM values accepted for good quality silage (20-35%) (Ergül, 1993). Crude protein content of WTB was determined 16.32% while the CP value of the control silage was found 17.51%. In the present study, DMSBP addition diminished CP content with increasing rate of DMSBP addition. The difference in the CP values was depending on the amount of seeds than the peels content involved in the tomato

pomace (Bradowski and Geisman, 1980; Ensminger et al., 1990; Haşimoğlu et al., 1979) Increment of DMSBP level lowered CP value of silages due to low CP content of DMSBP than the that of tomato pomace. In this study CP value (17.51%) of control silage was found lower than previous studies values (Weiss et al., 1997; Çapçı et al., 2002; Denek and Can, 2006; Mirzaei et al., 2008; Shabtay et al., 2008; Orosz et al., 2012; Mendez-Llorente et al., 2014; Wu et al., 2014). In the study conducted by Denek and Can (2006), tomato pomace silage CP values prepared with addition of 10%, 15% and 20% wheat straw were lower than the CP values of current study. This difference might be from the fact that researchers used wheat straw as an adsorbent with a very low content of CP to improve the level of silage DM. Whereas the ADF and NDF values of the silage material WTP in this study were found 43.44% and 45.53%, respectively. The ADF and NDF values of the control silage were found 49.29% and 55.72. While these values were similar to some previous researches (Çapçı et al., 2002; Tahmasbi et al. 2003; Denek and Can, 2006; Wu et al. 2014), higher than the values (14.4%-22.2%) reported by Mendez-Llorente et al. (2014). These differences may be attributed to different production technologies WTP. Type and harvest time of the tomato due to geographical differences can be other factors effecting CP content. ADF and NDF values of silages decreased by adding DMSBP compared with control silage. Inclusion of DMSBP to WTP were lowered ADF and NDF values of silages because of poor ADF and NDF content of DMSBP. The *in vitro* organic matter digestibility (IVOMD) value (58.23) obtained from the control silage in this study were similar to the IVOMD value of previous studies (53.74- 57.34%) reported by Çapçı et al. (2002) and Denek and Can (2006).. Depending on the DMSBP additions, IVOMD and ME values were increased compared to the control silage values. IVOMD and ME values were decreased depending on the increment of ADF and NDF values of silages.

The pH value (3.43) obtained from the WTP control silage in the present study was found lower than pH values (3.89, 3.92, 3.99, 4.01, 4.35) reported in former studies (Çapçı et al., 2002; Denek and Can, 2006; Orosz et al., 2012; Tahmasbi et al., 2003; Weiss et al., 1997). pH values of silage is an important parameter for determining the silage fermentation quality. pH values (3.40-3.45) of the control silage and DMSBP including were found closer to pH value range (3.5-4.2) for value of good quality silages (Açıkgöz et al., 2002; Kılıç, 2006). Ammonia nitrogen (NH<sub>3</sub>-N/TN) level obtained in the control silage (6.31% NH<sub>3</sub>-N/TN) in this study was found lower than silage with NH<sub>3</sub>-N level (10.32%

NH<sub>3</sub>-N/TN) reported by Weiss et al. (1979) and higher than value (3.11% NH<sub>3</sub>-N/TN) indicated by Tahmasbi et al. (2003), and similar to value (6.18% NH<sub>3</sub>-N/TN) obtained by Savrunlu and Denek (2016). The NH<sub>3</sub>-N values of the tomato pomace silages prepared by adding different levels of DMSBP were found in the range of 5.49 and 6.36%, in this study. NH<sub>3</sub>-N level decreased depending on the increase in DMSBP addition. Silage NH<sub>3</sub>-N values, which is one of the most important criteria in determining the silage fermentation quality, occur as a result of degradation of the proteins in the silage by clostridial microorganisms and it depends on high protein low DM content of ensilage material (Kung, 2010). Inclusion of DMSBP addition to the TPS decreased CP content and increased DM levels, therefore DMSBP decreased in NH<sub>3</sub>-N levels of the silages. Plant protease enzymes in the silage are a main a factor for ammonia nitrogen production and low pH reduces the degradation of proteins via inactivating the undesirable anaerobic microorganisms such as enterobacteria and clostridia (Kung, 2010). The pH values (3.40-3.45) of all silages in this study were might be reason for low NH<sub>3</sub>-N values. Degradation of proteins into NH<sub>3</sub>-N through degradation is undesirable in quality silages. Hence, NH<sub>3</sub>-N/TN value of good quality silages is expected to be lower than 11% (Carpintero et al., 1979). The NH<sub>3</sub>-N/TN values (5.49-6.36% NH<sub>3</sub>-N/TN) derived from all the silages in the present study were found to be lower than the upper limit (11% NH<sub>3</sub>-N/TN) reported by Carpintero et al. (1979). Silage lactic acid content at the level of 65-70% of the total silage acids shows good silage fermentation (Kung, 2010). In this study, the rate of lactic acid content in the control silage and 3, 5, 7 and 10% DMSBP added silages was determined above (75.2% and 65.87%) the stated rate (i.e. 65-72%) while the lactic acid level values obtained from the 15, 20 and 25% DMSBP additions were closer to the rates (65-72%) reported by Kung (2010). The existence, type and number of bacteria on the silage product considerably affect the silage fermentation quality (Kung, 2010). While the homofermentative lactic acid bacteria present in the environment during silage fermentation produce lactic acid from the sugar as the primary product, the heterofermentative lactic acid bacteria also produce secondary products including ethyl alcohol, acetic acid, diacetyl and carbon dioxide apart from lactic acid (Blandino et al., 2003; Holzappel and Wood, 1995; Kung, 2008). It has been reported that increased silage acetic acid concentration inhibits mold formation and increases silage aerobic stability (Sucu ve Filya, 2006). In this study, high acetic acid level was measured due to low dry matter of the tomato pomace. High nitrogen

amount and heterofermentative bacteria existence probably caused high buffer capacity and lead to fermentation continuity (Kung, 2010). Acetic acid level increased in the silages with 3 and 5% additions DMSBP whereas it decreased in the silages with 7, 10, 15, 20 and 25% addition of it. The acetic acid contents (14.35 and 20.38 g/kg DM) of the silages in the present study were determined lower than the reported 30 g/kg DM value for good quality silages (Kung, 2010). Propionic acid was not detected in the control silage and the silage prepared by adding 3% DMSBP. The propionic acid content was found 0.32-1.35 g/kg range on DM dry matter basis. Gradually increment (5, 7, 10, 15, 20 and 25%) of DMSBP raised propionic acid content of silages. . The propionic acid contents of the present study were found to be lower than the values reported by Carpintero et al. (1979). Even though propionic acid bacteria, which are not resistant to low pH, could produce propionic acid from lactic acid and glucose, it was considered doubtful that propionic acid may or not produced in good fermented silages (Kung, 2010). The propionic acid, which the last product of some types of clostridial bacteria is commonly observed at the level of >3-5 g/kg DM in poor fermented silages (Kung, 2008; Kung, 2010). In the present study, butyric acid was not detected in any silage. In addition, bad smell, spoilage, yeast and mold development were not observed. It was documented that short-chain volatile fatty acids such as acetic, propionic and butyric acids prevents aerobic spoilage in the silages by particularly suppressing yeast and mold development (McDonald et al., 1991).

It was concluded that wet tomato pomace could be ensiled without adding any additive; however, it could be ensiled with dried sugar beet pulp including molasses due to its high water retention capacity and dry matter content. Moreover, the present study demonstrates that all the silages obtained by addition of DMSBP dried molasses sugar beet pulp can be considered as quality silage. The wet tomato pomace silages including 10-15% dried sugar beet pulp could be used as a quality roughage resource for ruminants because of its high dry matter content and contribution to fermentation quality in addition to both the environmental and economic benefits.

## References

Abbeddou S, Rischkowsky B, Hilali MED, Haylani M, Hess HD, Kreuzer M, 2015: Supplementing diets of Awassi ewes with olive cake and tomato pomace: on-farm recovery of effects on yield, composition and fatty acid profile of the milk. *Tropical Animal Health and Production*, 47,1, 145-152.

- Açıkgoz E, Turgut İ, Filya İ, 2002: Silaj Bitkileri Yetiştirme ve Silaj Yapımı. Hasat Yayınları, pp: 86, İstanbul.
- Association of Official Analytical Chemistry (AOAC), 2005: Official Methods of Ana-lysis of AOAC International, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Blandino A, Al-Aseer ME, Pandiella SS, Cantero D, Webb C, 2003: Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Research International*, 36, 527-543.
- Bradowski DL, Geisman JR, 1980: Protein content and amino acid composition of seeds from tomatoes at various stages of ripeness. *J Food Sci*, 45, 228-229.
- Broderick GA, Kang JH, 1980: Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63, 64-75.
- Caluya RR, Sair RR, 1995: Exploratory trial on the feeding of tomato pomace to growing cattle. Paper presented at the 1995 Livestock and Forage Commodity Review, Ilocos Agriculture and Resources Research and Development Consortium, Don Mariano Marcos Memorial State University, June 10-11, pp:6, Bacnotan, La Union,
- Carpintero CM, Henderson AR, McDonald P, 1979: The effect of some pre-treatments on proteolysis during the ensiling of herbage. *Grass Forage Science*, 34, 311-315.
- Çapçı T, Şayan Y, Alçiçek A, 1995: Kurutulmuş ve silolanmış domates posasının yem değerleri üzerine bir çalışma. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 32, 3, 119-126.
- Çapçı T, Şayan Y, Kırkpınar F, Taluğ AM, Açıkgoz Z, Ergül M, Karaayvaz BK, 2002: Kanatlı altlığının bazı yem kaynakları ile silolanma olanakları ve yem değeri III: Domates posasının broyler atlığı ile silolanma olanakları ve yem değeri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 39, 1, 55-62.
- Denek N, Can A, 2006: Feeding value of wet pomece ensiled with wheat straw and wheat grain for Avassi sheep. *Small Ruminant Research*, 65, 260-265.
- Denek N, Can A, 2005: Buğday samanı ve buğday kırmısı ile hazırlanan domates posası silajının besleyici değeri. Poster bildiri, III. Ulusal Hayvan Kongresi, pp:582-586, 7-10 Eylül Adana.
- Di Blasi C, Tanzi V, Lanzetta M, 1997: A study of the production of agricultural residues in Italy. *Biomass and Bioenergy*, 12, 5, 321-331.
- Dubois M, Giles KA, Hamilton JK, Rebes PA, Smith F, 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem*, 28, 350-356.
- Ensminger ME, Oldfield JL, Heinemann WW, 1990: Feeds and Nutrition. Ensminger Publishing Co., pp:122-136, USA.
- Ergül M, 1993: Yemler Bilgisi ve Teknolojisi. 2. Baskı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, pp: 318, İzmir.
- FAO, 2013: Utilization of fruit and vegetable wastes as livestock feed and as substrates for generation of other value added products. RAP Publication 2013/04.
- Gasa J, Castrillo C, Baucells M.D, Guada JA, 1989: By-Products from the canning industry as feedstuff for ruminants, Digestibility and its prediction from

- chemical composition and laboratory bioassays. *Anim Feed Sci Technol*, 25, 67-77.
- Hadjipanayiotou M, 1994: Laboratory evaluation of ensiled olive cake, tomato pulp and poultry litter. *Livestock Research for Rural Development*, 6, 2, 6-15.
- Haşimoğlu S, Çakır A, Aksoy A, Özen N, 1979: Domates salçası artıklarının (kuru domates posası) kaba yem olarak kullanılma olanağı üzerine bir çalışma. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10, 139-150.
- Holzapfel WH, Wood BJB, 1995: Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective, (Wood B.B. and Holzapfel WH, editors), The General of Lactic Acid Bacteria, Vol: II, Blackie Academic-Professional, pp: 1-6, London.
- Karabulut A, Filya İ, Canbolat Ö, Değirmencioğlu T, Umur H, 1999: Değişik yöntemlerle işlenmiş domates posası silajlarının kuzu besisinde kullanılma olanakları. Uluslararası Hayvancılık Kongresi, 21-24 Eylül, İzmir.
- Kılıç A, 2006: Kaba Yemlerde Niteliğin Saptanması. Hasat Yayıncılık, İstanbul, pp:159, 2006.
- Kung JRL, 2008: Silage fermentation end products and microbial populations: Their relationships to silage quality and animal productivity. Proceeding Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners, Charlotte, NC. pp: 25-27, 2008.
- Kung JRL, 2010: Understanding the biology of silage preservation maximize quality and protect the environment. In Proceeding California Alfalfa and Forage Symposium, pp: 41-54 Visalia.
- McDonald P, Henderson A, Heron SJE, 1991: The Biochemistry of Silage (2nd Ed.). Chalcombe Publ., Churchiane, Kingston, Canterbury, Kent, UK.
- Mendez-Llorente F, Aguilera-Soto JI, Lopez-Carlos MA, Ramirez RG, Carrillo-Muro O, Escareio-Sanchez LM, Medina-Flores CA, 2014: Preservation of fresh tomato waste by silage. *Interciencia*, 39, 6, 432-434.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W, 1988: Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28, 7-55.
- Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D, Schneider W, 1979: The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. *Journal of Agricultural Science, Cambridge*, 93, 217-222.
- Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N, 2008: Nutritive value of some agro-industrial by-products for ruminants-A review. *World Journal of Zoology*, 3, 2, 40-46.
- Orosz S, Szemethy L, Szabo Z, Kazinczy S and Gallo J, 2012: XVI. International Silage Conference, pp: 440-443, Hameenlinna, Finland, 2-4 July.
- Polan CE, Stieve DE, Garrett JL, 1998: Protein preservation and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. *Journal of Dairy Science*, 81,765-776.
- Savrunlu, M, Denek N, 2016: Farklı Seviyelerde Yaş Domates Posası İlavesi ile Hazırlanan Mısır Silajının Kalitesinin Araştırılması. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 5, 2, 5-11.
- Shabtay A, Eitam H, Tadmor Y, Orlov A, Meir A, Weinberg P, Weinberg ZG, Chen Y, Brosh A, Izhaki I, Kerem Z, 2008: Nutritive and anti oxidative potential of fresh and stored pomegranate industrial by-product as a novel beef cattle feed. *J Agric Food Chem*, 56, 10063-10070.
- SPSS, 1991: Inc. Statistical package for the social sciences (SPSS/PC+). Chicago, IL.
- Sucu E, Filya İ, 2006: Effects of homofermentative lactic acid bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability characteristics of low dry matter corn silage. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(1), 83-88,
- Suzuki M, Lund CW, 1980: Improved gas liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 1040-1041
- Tahmasbi R, Saremi B, Naserian A, 2003: Evaluating chemical characteristics of mixed corn plant and tomato pomace silage using experimental silos. *Journal of Dairy Science*, 86 (Suppl.)1, 44.
- TUIK, 2014: Turkish Statistical Institute, Number: 15974, 29. Acces Date: 17.12.2014.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA, 1991: Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
- Ventura MR, Pieltin MC, Castanon JIR, 2009: Evaluation of tomato crop by-products as feed for goats. *Animal Feed Science and Technology*, 154, 271-275.
- Weiss WP, Frobase DL, Koch ME, 1997: Wet tomato pomace ensiled with corn plants for dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80, 2896-2900.
- Wu JJ, Du RP, Gao M, Sui YQ, Xiu L, Wang X, 2014: Naturally occurring lactic acid bacteria isolated from tomato pomace silage. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(5), 648-657.

\*\* : This study is summarized in Halim Gökhan SARGIN's Master of Science Thesis.

**\*Corresponding Author:** Halim Gökhan SARGIN,  
Ministry of Food, Agriculture and Livestock,  
Buyukorhan, Bursa, Turkey.  
e-mail: hgsargin@gmail.com



# Güvercinde (*Columbidae columbiformes*) Pekten Okulinin Histomorfolojik Yapısı

Deniz KORKMAZ

Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.

Geliş Tarihi: 10.04.2017

Kabul Tarihi: 09.05.2017

**Özet:** Yapılan çalışmada güvercinde pekten okulinin histomorfolojik olarak araştırılması ve diğer kanatlı türleriyle farklılıklarının ortaya konulması amaçlandı. Çalışma materyalini Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesine getirilen ve kurtarılamayan iki adet güvercinlerden alınan sağlıklı göz dokusu örnekleri oluşturdu. Alınan doku örnekleri %10'luk nötral tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemlerinden sonra bloklanan örneklerden seri kesitler alındı. Alınan bu kesitler Crossman'ın üçlü boyama yöntemiyle boyanarak araştırma mikroskopunda incelendi. Diğer kanatlı türlerinde olduğu gibi güvercinde de pekten okulinin nervus optikusun retinaya giriş bölgesinden vitreusa doğru uzandığı tespit edildi. Diğer kanatlılardan farklı olarak güvercinde pekten okulinin oturduğu kalın bazal laminada retinanın tamamıyla kopuntuya uğramadığı, optik sinir telleri katının bir süre daha devam ettiği görüldü. Pektenin oturduğu bazal kısımda büyük çaplı damarlara rastlandı. Bu damarların koroidden gelen damardan köken aldığı belirlendi. Bazaldan apikale doğru gidildikçe damar çaplarının küçüldüğü tespit edildi. Bu nedenle damarlar çaplarına göre primer, sekonder ve tersiyer damarlar olarak sınıflandırıldı. Sınıflandırılan her damar grubundan rastgele örnekleme yöntemiyle 20 tanesinin çapları ölçülerek, ortalama damar çapı değerleri elde edildi. Pektenin bazal kısmında ayrıca az miktarda melanositlere de rastlandı. Bu melanositlerin de koroidin lamina vaskulozusunda bulunan melanositlerden köken almış olabileceği düşünüldü. Pektenin apikale doğru uzanan kıvrımlarında damarlar ve melanositlerin yanı sıra pektenal hyalositlere de rastlandı. Yapılan çalışmada elde edilen bulgular ile güvercin pekten okulisinde pekten damarlarının ve melanositlerin koroidden köken aldığı ilk olarak kanıtlanmış bulunmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Damar, Güvercin, Histomorfoloji, Melanosit, Pekten okuli.

## Histomorphological Structure of Pecten Oculi in Pigeons (*Columbidae columbiformes*)

**Abstract:** It is aimed to research the histomorphological structure of pecten oculi in pigeons and to suggest the differences between other types of avian. Tissue samples from healthy eyes obtained from two pigeons came to the animal hospital were used. Tissue samples were fixed in 10% neutral-buffered formalin solution for 24 hours. After fixation samples were treated routine procedure and blocked. Serial sections were taken from the blocked. Those sections were examined under the microscope after stained with by Crossman's triple stain. The pecten oculi projects from the optic nerve head into the vitreous chamber. Differently, it was seen that retina in pigeons was not completely separate from pecten base and ganglion cell layer were continued for a bit more. There were vessels with wide diameters on the basal part where pecten was located. This vessel was found to have originated from choroid. It was also seen that vessel diameters got smaller as it went to the apical from the basal. So, the vessels were classified as primer, secondary, and tertiary vessel. Diameters of 20 randomly chosen vessels from each sections were measured and an average diameter value was found. There was also a little amount of melanocyte in the basal part of the pecten. These melanocytes were based on the laminated vasculosa of the choroid. Pecten oculi were covered pecteneal membrane. Besides pecteneal hyalocytes were found in the pecteneal limiting membrane. According to the findings of the study, it was first proven to have originated from choroid that pigeon's veins and melanocytes at the pecten oculi.

**Keywords:** Vessel, Pigeon, Histomorphology, Melanocyte, Pecten oculi.

## Giriş

Kanatlılar kafalarına oranla oldukça büyük gözlere sahiptir (King ve McLelland, 1984). Ayrıca kanatlı gözünde pecten okuli diye adlandırılan eşsiz bir anatomik yapı bulunmaktadır. Pekten okulinin intra oküler basıncı ve pH'yı dengelediği (Schaepdrijver ve ark., 1989), gözün savunmasında görev aldığı (Uehara ve ark., 1996) ve tamamen damarsız olan kanatlı retinasını beslediği (Kiama ve ark., 2001) düşünülmektedir. Oldukça damarlı ve pigmentli bir organ olan pekten okuli, nervus optikusun retinaya giriş bölgesinden vitreus boşluğuna doğru uzanır (Brach, 1977). Morfolojik

olarak, yalnızca Kivi kuşlarında rapor edilen koni tipi pekten okuli, devekuşlarında rapor edilen pervane tipi pekten okuli ve diğer birçok kuş türünde görülen kıvrımlı tip pekten okuli olmak üzere üç grupta sınıflandırılmıştır (Meyer, 1977).

Pekten okuli, nervus optikustan vitreusa doğru uzanırken kıvrımlar yapar. Bu kıvrımların sayısı, şekli ve uzunluğu hayvan türlerine göre farklılık göstermektedir (Braekevelt, 1991; Rahman ve ark., 2010; Smith ve ark., 1996). Yapılan histolojik çalışmalarda pekten okuli kıvrımlarında bol miktarda farklı çaplarda damarlara ve melanositlere

rastlandığı bildirilmektedir (Braekevelt ve Richardson, 1996; Braekevelt, 1993; Dayan ve Ozaydin, 2013). Elektron mikroskopik çalışmalarda pekten kapillarlarının etrafında perisitlerin varlığından da söz edilmektedir (Braekevelt, 1991a). Pekten okuli vitreo-pekteneal membran adı verilen bir bazal membranla sarılmıştır (Uehara ve ark., 1996). Bazı türlerde bu membran üzerinde hyalosit adı verilen makrofaq benzeri hücrelere rastlanmıştır (Orhan ve ark., 2011; Pourlis, 2013).

Sunulan çalışmada, güvercine ait pekten okulinin histomorfolojik ve histometrik olarak incelenmesi ve diğer kanatlı türleriyle aralarındaki benzerlik ve farklılıkların ortaya konulması amaçlanmıştır.

## Materyal ve Metot

Çalışmada materyal olarak Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi'ne getirilen ve

kurtarılamayan iki adet yabancı güvercinden alınan doku örnekleri kullanıldı. Alınan doku örnekleri %10 nötral tamponlu formalin solüsyonunda 24 saat tespit edildikten sonra 24 saat yıkamaya alındı. Rutin doku takip prosedürlerine göre dereceli alkollerden ve xylolden geçirilen doku örnekleri parafinde bloklandı. Bloklanan bu doku örneklerinden 5µ kalınlığında alınan seri kesite Crossman'ın modifiye üçlü boyama yöntemi uygulandı (Crossman, 1937; Denk ve ark., 1989). Boyanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus Cover, 018 model) incelendi. Pekten okuli kıvrımlarında gözlenen ve rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen primer, sekonder ve tersiyer 20 ayrı damar çapı Bs200Pro görüntü analiz programı (BAB software) ile ölçüldü. Elde edilen verilerin ortalamaları ve standart hataları alınarak her gruba ait damarların ortalama çapları tespit edildi (Tablo 1).

**Tablo 1.** Primer, sekonder ve tersiyer damarların çaplarına ait veriler (µm)

Primer Damar En	Primer Damar Boy	Primer Çap	Sekonder Damar En	Sekonder Damar Boy	Sekonder Çap	Tersiyer Damar En	Tersiyer Damar Boy	Tersiyer Çap
33.77	186.83	79.43	38.33	57.49	46.94	18.36	20.64	19.46
45.53	135.43	78.52	42.3	54.05	47.81	12.35	19.02	15.32
64.14	331.37	145.78	46.9	68.89	56.84	16.74	16.73	16.73
68.97	273.37	137.31	41.43	63.85	51.43	16.58	15.82	16.19
56.25	312.98	132.68	45.58	53.4	49.33	14.65	13.9	14.27
58.64	300.5	132.74	42.21	87.92	60.91	12.15	19.62	15.43
54.98	179.43	99.32	69.84	57.65	63.45	9.6	23.14	14.90
45.58	155.06	84.06	26.21	123.01	56.78	13.72	18.29	15.84
79.15	148.45	108.39	17.11	83.11	37.70	14.3	46.76	25.85
64.51	339.09	147.90	38.8	58.96	47.82	12.81	11.57	12.17
45.86	158.04	85.13	17.76	74.61	36.40	23.62	26.52	25.02
52.34	209.39	104.68	34.28	64.87	47.15	12.56	15.61	14.00
49.94	133.44	81.63	40.59	60.84	49.69	14.61	18.7	16.52
52.24	311.43	127.55	31.08	88.19	52.35	19.1	16.09	17.53
53.04	127.08	82.09	50.11	111.76	74.83	12.75	24.35	17.61
51.71	140.71	85.30	37.2	62.21	48.10	15.28	24.64	19.40
64.4	283.37	135.08	53.38	132.84	84.20	14.65	19.13	16.74
49.71	351.3	132.14	33.52	189.68	79.73	16.2	24.74	20.01
60.67	268.3	127.58	44.86	65.38	54.15	14.39	32.72	21.69
<b>Ortalama</b>		110.91			55.03			17.62
<b>Standart Sapma</b>		24.88			12.51			3.48

## Bulgular

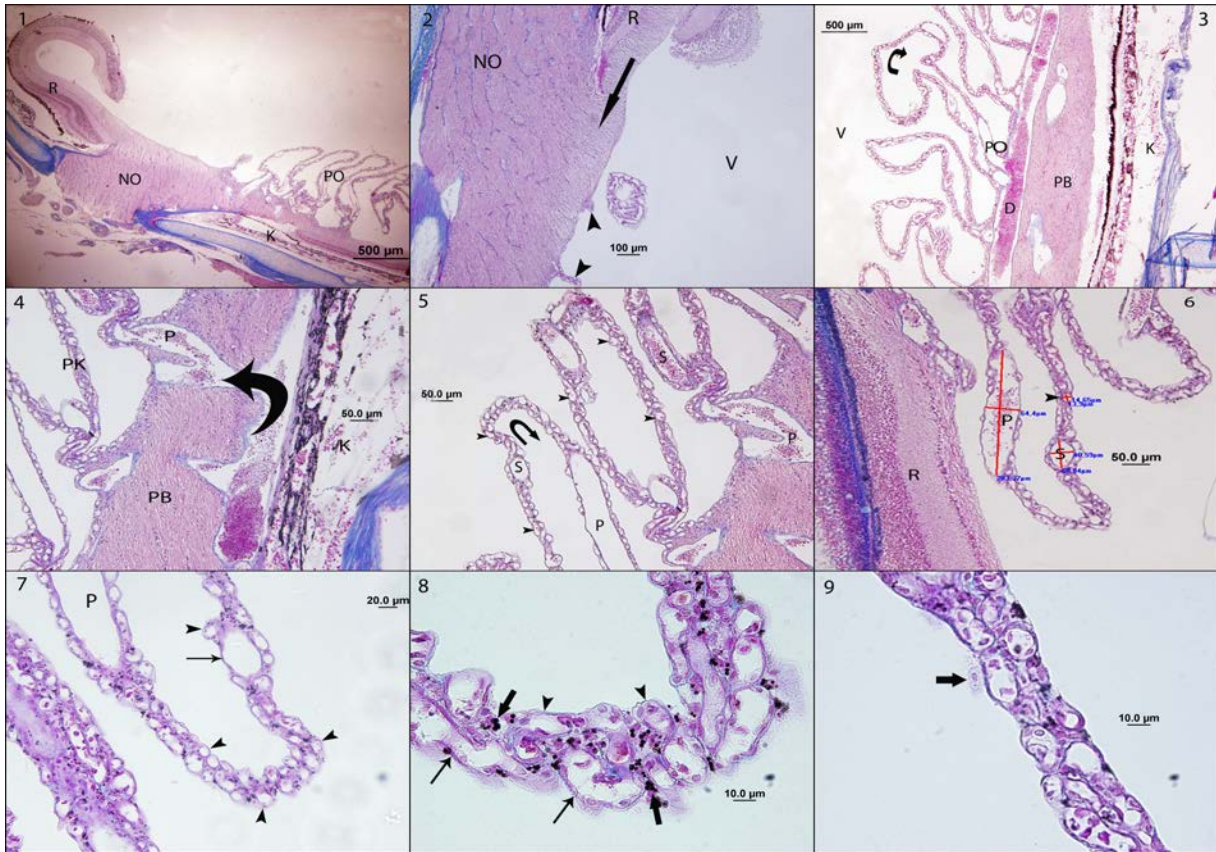
Makroskopik incelemeler sonucu, güvercinde pekten okulinin kıvrımlı şekilli olduğu gözlemlendi. Pekten okuli yaklaşık 14-15 adet fan benzeri kıvrımdan oluşmaktaydı. Pekten geniş bir temel üzerine oturmuştu ve pekten kıvrımları apikalde bir köprüyle birbirine bağlanmaktaydı. Makroskopik olarak bakıldığında, pekten okulinin nervus optikusun göz küresine giriş bölgesinin hemen yanında yer aldığı gözlemlendi.

Mikroskopik incelemelerde, pekten okuli nervus optikusun retinaya giriş bölgesinde geniş bir temel üzerine (pekten bazali) oturduğu ve buradan da kıvrımlar yaparak apikale doğru uzandığı belirlendi (Şekil 1). Pekten bazalinin sağında ve solunda retina tabakasının olduğu gözlemlendi. Retinanın pekten bazalinin başladığı kısımda tamamıyla kopuntuya uğramadığı ve retina sinir telleri katının bu temel üzerinde bir süre daha

devam ettiği belirlendi (Şekil 2). Retina sinir telleri katı pekten kıvrımlarının ortaya çıkmasıyla kaybolduğu, pekten kıvrımlarının ise apikale doğru ilerlerken dirseklenecek geriye doğru döndüğü ve pekten bazaline tekrar bağlandığı gözlemlendi (Şekil 3).

Pekten bazalinde büyük çaplı damarlara rastlandı. İncelenen kesitlerde koroidin lamina vaskulozasından gelen geniş çaplı bir damarın nervus optikusuna delerek pekten bazaline doğru ilerlediği ve pekten kıvrımlarındaki damarlara bağlandığı tespit edildi (Şekil 4, Şekil 5). Pekten bazalinden apikale doğru ilerleyen damarların çaplarının küçüldüğü tespit edildi. Bu nedenle damarlar çaplarına göre primer, sekonder ve tersiyer damarlar olarak sınıflandırıldı. Sınıflandırılan her damar grubundan rastgele 20 tanesinin çapları ölçülerek ortalama damar çapı değerleri elde edildi

(Tablo 1, Şekil 6). Elde edilen verilere bakıldığında pektenin bazalinde ve pekten kıvrımlarının bazal yarısına yakın kısımlarında yoğun olarak gözlenen primer damar çaplarının ortalama  $110.91 \pm 24.88 \mu\text{m}$  olduğu belirlendi. Pekten kıvrımlarında apikale doğru gidildikçe primer damarların kaybolduğu gözlemlendi. Pekten kıvrımların orta kısımların sekonder damarlar bulunmaktaydı. Tersiyer damarlar ise sekonder damarların etrafında pekteneal bazal membrana yakın bölgede yoğunlaşmaktaydı. Tersiyer damarlar tıpkı tespih taneleri gibi art arda iki sıra halinde dizilmekteydi (Şekil 7). Elde edilen veriler değerlendirildiğinde sekonder damarların ortalama çapları  $55.03 \pm 12.51 \mu\text{m}$  olarak tespit edilirken tersiyer damarların ortalama çapları  $17.62 \pm 3.48$  olarak belirlendi (Tablo 1, Şekil 6).



**Şekil 1-3.** Güvercinde pekten okulinin genel histolojik görünümü. D: Damar, K: Koroid, PB: Pekten Bazali, PO: Pekten Okuli, R: Retina, V: Vitreus, ok: Retina sinir telleri katı, ok başları: Pekten kıvrımlarının başlangıcı, kıvrılmış ok: Pekten kıvrımının dirseklenmesi. **Şekil 4-5.** Güvercinde pekten okulinin ve damarlarının histolojik görünümü. K: Koroid, PB: Pekten bazali, PK: Pekten kıvrımı, P; Primer damar, S; Sekonder damar, kalın eğik ok; Koroidden gelen damar, ince kıvrılmış ok; Pekten dirseklenmesi, ok başları; Tersiyer damarlar. **Şekil 6.** Güvercinde pekten okuli damar çaplarının ölçümü. R: Retina, P: Primer damar, S: Sekonder damar, ok başları: Tersiyer damar. **Şekil 7.** Güvercinde pekten okuli damarlarının histolojik görünümü. P: Primer damar, ok: Sekonder damar, ok başı: Tersiyer damar. **Şekil 8.** Güvercinde pekten kıvrımlarının histolojik görünümü. Kalın ok: Melanosit, ince oklar: Sekonder damar, ok başları: Tersiyer damar. **Şekil 9.** Güvercinde pekten kıvrımının histolojik görünümü. Ok: Hyalosit.

Pektenin bazal kısmında primer damarlar dışında az miktarda melanositlere de rastlandı. Bu melanositlerin çoğunlukla koroidden gelen damarların etrafında bulunduğu ve yoğunluklarının

apikale doğru gidildikçe arttığı gözlemlendi. Her ne kadar bu hücrelerin sekonder ve tersiyer damarların aralarını doldurmuş oldukları gözlemlense de başlıca pekteneal membranın altında yoğunlaştığı tespit

edildi. Önceden çalışılan diğer kanatlı türleriyle karşılaştırıldığında ise güvercin pekten okulisinde bulunan melanositlerin yoğunluğunun daha az olduğu belirlendi (Şekil 8).

Pekteneal membranla çevrili olan pekten okulide membranın hemen üstünde pekten kıvrımlarına yapışık halde pekteneal hyalositlerin de bulunduğu tespit edildi (Şekil 9). Melanositlere benzer şekilde bu hücrelerin de diğer kanatlı türlerine göre güvercinlerde daha seyrek olarak görüldüğü tespit edildi.

## Tartışma ve Sonuç

Yapılan çalışmalarda, yalnızca kanatlı gözünde bulunan ve birçok farklı fonksiyona sahip olduğu düşünülen pekten okuli yapısının hayvan türlerine göre değiştiği belirlenmiştir (Braekevelt, 1991; Orhan ve ark., 2011; Rahman ve ark., 2010). Pecten okulinin şekli, uzunluğu ve pekten kıvrımlarının sayısı türlere göre farklılık göstermektedir. Avustralya Galah'ında (Braekevelt ve Richardson, 1996) ve Japon orman kargalarında (Rahman ve ark., 2010) yaklaşık 20-25 adet fan şeklinde pekten kıvrımı tespit edildiği bildirilirken baykuşta akordion benzeri 8-10 kıvrım (Smith ve ark., 1996) ve büyük mavi balıkçıda (Braekevelt, 1991a) fan benzeri yaklaşık 10-14 kıvrım bulunduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada, güvercinlerde yaklaşık 15 adet fan benzeri pekten kıvrımı olduğu tespit edildi. Güvercinlerin kıvrım sayısının balıkçılar gibi küçük kafalı kuşlara benzer olduğu belirlendi. Bununla birlikte güvercinde pekten kıvrımlarının apikale doğru ilerlerken kıvrım yaparak geri döndüğü ve tekrar bazale bağlandığı gözlemlendi. Bu oluşum, güvercinde pekten okulinin şeklinin neden kemer biçimde (Tucker, 1975) görüldüğünü ortaya koymaktadır. Şekilleri farklı olsa da tüm kanatlı pekten okulilerinde, bol miktarda kapillar damarlar ve melanositlere rastlandığı belirtilmektedir (Dayan ve Ozaydın, 2013). Elektron mikroskopik incelemelerde ise kapillar damarların etrafında perisitlerin de bulunduğu bildirilmektedir (Braekevelt, 1991a). Sunulan çalışmada, diğer kanatlı türlerine benzer şekilde güvercinlerde de bol miktarda kapillar damar bulunduğu ancak melanositlerin ve hyalositlerin yoğunluğunun az olduğu belirlendi.

Yapılan araştırmalarda, pekten kıvrımlarında bulunan kapillar damarların hayvan türüne bağlı olarak farklı çapta ve yoğunlukta olabileceği belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda pekten kıvrımlarında büyük çaplı damarlar ve kapillarların varlığından söz edilmektedir (Rahman ve ark., 2010). Diğer bazı çalışmalarda ise afferent ve efferent damarlar olarak adlandırılan büyük ve küçük çaplı damarlardan bahsedilmektedir (Onuk ve ark., 2013).

Yapılan komparatif bir çalışmada (Dayan ve Ozaydın, 2013) ise farklı hayvan türleri arasında pekten damarlarının çapı karşılaştırılmış ve devekuşu, ördek, güvercin, hindi ve sığırcıkta ortalama damar çapları sırasıyla 20.23, 14.34, 11.78, 12.58 ve 12.78 µm olduğu bildirilmiştir. Güvercinlerde yapılan bu çalışmada ise üç farklı çapta damar olduğu dikkati çekti. Bu nedenle damarlar primer, sekonder ve tersiyer damarlar olarak sınıflandırıldı. Primer damarların pekten bazalinden başladığı ve pekten kıvrımlarının bazale yakın kısmında yoğunlaştığı belirlendi. Sekonder ve tersiyer damarların ise pekten kıvrımlarının apikale doğru uzanan kısımlarında olduğu gözlemlendi. Sekonder damarlar kıvrımların ortasında yer alırken tersiyer damarların bunları sardığı ve pekteneal membran altında yerleştiği dikkati çekti. Pecten kıvrımının en apikale doğru ise tersiyer damarların iki sıra halinde boncuk gibi dizildiği ve sayılarının yoğunlaştığı gözlemlendi. Sunulan çalışmada, pekten kıvrımlarında damar çapları ölçüldüğünde primer damar çaplarının ortalama 110.91±24.88 µm, sekonder damar çaplarının ortalama 55.03±12.51 µm mikrometre ve tersiyer damar çaplarının ortalama 17.62±3.48 µm olduğu belirlendi.

Pecten okulinin tüm kanatlılarda pekteneal sınırlayıcı membran adı verilen ince bir bağ dokuyla çevrelediği bildirilmektedir (Brach, 1977; Smith ve ark., 1996). Bazı kanatlı türlerinde bu bağ doku etrafında hyalosit adı verilen ve makrofaj benzeri hücre olarak adlandırılan hücrelere de rastlanılmaktadır (Korkmaz ve Kum, 2016). Tavuk (Uehara ve ark., 1996) ve ördekte (Braekevelt, 1998) pekteneal hyalosit varlığından söz edilmekteyken kırmızı kuyruklu atmaca (Braekevelt, 1991) ve kargada (Braekevelt, 1994) hyalositlere rastlanmadığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada tıpkı tavuk ve ördekte olduğu gibi güvercinlerde de pekteneal hyalositler tespit edildi.

Sonuç olarak, güvercinlerde pekten okulinin yapısı histomorfolojik olarak ortaya konuldu. Daha önce çeşitli kanatlı türlerinde pekten okuli üzerine yapılmış sayısız araştırma bulunmaktadır (Braekevelt, 1994; Smith ve ark., 1996). Sunulan çalışmada yaban güvercininde pekten okulinin yapısı histomorfolojik olarak incelendi ve pekten kıvrım sayısı yönünden balıkçılarla, damar yoğunluğu ile diğer birçok kanatlı türüyle benzerlik gösterdiği ortaya konuldu. Pecten okulinin embriyolojik dönemde koroid yarığının kapanması sırasında ortaya çıktığı ve koroidden köken aldığı bildirilmektedir (Romanoff, 1960). Ancak erişkin kanatlı türleriyle ilgili şimdiye kadar yapılan çalışmalarda kroid-pekten ilişkisine dair herhangi bir verinin ortaya konmadığı görülmektedir. Sunulan çalışmada yaban güvercininin pekten okuli bölgesinde yer alan kapillarlarının koroidin lamina

vaskulosa'sından çıkan büyük çaplı damarlarla olan bağlantısı ortaya kondu. Pekten okulide bulunan damarların çapları göz önünde bulundurulduğunda primer, sekonder ve tersiyer damarlar olarak 3 grupta incelenebileceği belirlendi. Yapılan çalışmanın bu yönüyle birçok çalışmaya kaynak oluşturacağı ve daha detaylı çalışmalarla pekten okuli için türlerde form-fonksiyon ilişkisinin irdelenebileceği düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Brach V, 1977: The functional significance of the avian pecten: a review. *Condor*, 79, 321-327.
- Braekevelt CR, 1991: Electron microscopic observation on the pecten oculi of the Gread Blue Heron. *Histol Histopathol*, 6, 345-351.
- Braekevelt, CR, 1991a: Fine structure of the pecten oculi in the Red-Tailed Hawk. *Anat Histol Embryol*, 8, 9-15.
- Braekevelt CR, 1993: Fine structure of the pecten oculi in the Great Horned Owl. *Histol Histopathol*, 8, 9-15.
- Braekevelt CR, 1994: Fine structure of the pecten oculi in the American crow. *Anat Histol Embryol* 23, 357-366.
- Braekevelt CR, 1998: Fine structure of the pecten oculi of the emu. *Tissue Cell* 30, 157-165.
- Braekevelt CR, Richardson KC, 1996: Fine structure of the pecten oculi in the Australian Galah (*Eolophus roseicapillus*) (Aves). *Histol Histopathol*, 11, 565-571.
- Crossman G, 1937: A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, 69, 33-38.
- Dayan MO, Ozaydin TA, 2013: Comparative morphomertical study of the pecten oculi in different avian species. *Sci World J*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/968652>
- Denk H, Kunzele H, Plenck H, Ruschoff J, Sellner W, 1989: Romeis microscopische tecnic, 17, Neubearbeitete Auflage. Urban und Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore, 439-450.
- Kiama SG, Maina JN, Bhattacharjee J, Weyrauch KD, 2001: Functional morphology of the pecten oculi in the nocturnal spotted eagle owl (*Bubo bubo africanus*), and the diurnal black kite (*Milvus migrans*) and domestic fowl (*Gallus gallusvar. domesticus*): a comparative study. *J Zool* 254, 521-528.
- King AS, McLelland J, 1984: Special sense organs. In: King AS, McLelland J, editors. *Birds: Their structure and function, 2nd ed. London: Baillie \_ee Tindall.* pp. 284-314.
- Korkmaz D, Kum S, 2016: Investigation of the antigen recognition and presentation capacity of pecteneal hyalocytes in the chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Biotech & Histochem*, 91, 3, 212-219.
- Meyer DB, 1977: The avian eye and its adaptations. In: Handbook of sensory physiology. Vol V1115. The visual system in vertebrates. Crescitelli F. (ed). Springer-Verlag. Berlin. 549-612.
- Onuk B, Tutuncu S, Alan A, Kabak M, 2013: Macroanatomic, light and scanning electron microscopic studies of the pecten oculi in the stork (*Ciconia ciconia*) *Microsc Res and Tech*, 76, 963-967.
- Orhan, OI, Ekim O, Bayraktaroğlu AG, 2011: Morphological investigation of the pecten oculi in quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *J Fac Vet Med Univ Ankara*, 58, 5-10.
- Pourlis AF, 2013: Scanning electron microscopic studies of the pecten oculi in the quail (*Coturnix coturnix Japonica*). *Anat Res Int*, <http://dx.doi.org/10.1155/013/650601>.
- Rahman ML, Lee E, Aoyama M, Suqita S, 2010: Light and electron microscopy study of the pecten oculi of the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). *Okajimas Folia Anat Jpn*, 87, 75-83
- Romanoff AL, 1960: The avian embryo: structural and functional development. 1st ed . Brett-Macmillan Ltd., Gald-Ontorio. pp. 397-404.
- Schaepdrijver L de, Simoens P, Lauwers H, Geest JP de, 1989: Retinal vascular patterns in domestic animals. *Res Vet Sci*, vol. 47, 1, 34-42.
- Smith BJ, Smith SA, Braekevelt CR, 1996: Fine structure of the pecten oculi of the barred owl (*Strix varia*). *Histol Histopathol*, 11, 1, 89-96.
- Tucker R, 1975: The surface of the pecten oculi in the pigeon. *Cell Tiss Res*, 157, 457-465.
- Uehara M, Imagawa T, Kitagawa H, 1996: Morphological studies of the hyalocytes in the chicken eye: scanning electron microscopy and inflammatory response after the intravitreal injection of carbon particles. *J Anat*, 188, 3, 661-669.

**Yazışma Adresi:** Deniz KORKMAZ  
Harran Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Şanlıurfa, Türkiye.  
e-mail: dekok@gmail.com

## Simental Irkı Bir Buzağıda Çoklu Ürogenital Sistem Anomalisi\*\*

Sadık YAYLA<sup>1\*</sup>, Engin KILIÇ<sup>1</sup>, Hasan ÖZEN<sup>2</sup>, Vedat BARAN<sup>1</sup>, Uğur AYDIN<sup>1</sup>, Emin KARAKURT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Kars, Türkiye.

<sup>2</sup>Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Kars, Türkiye.

Geliş Tarihi: 27.10.2016

Kabul Tarihi: 06.01.2017

**Özet:** Bu olgu sunumunda; bir buzağıda çoklu ürogenital sistem anomalisi olarak bilinen ve atresia ani et vulva, kloaka oluşumu, vaginal ektopi ve koksigeal agenesiyi içeren olgunun tanımlanması ve sağaltım sonuçlarının değerlendirilmesi amaçlandı. Olgumuzu kuyruk yokluğu ve perineal bölgede bir kitle şikâyeti ile kliniğimize getirilen simental ırkı, 2 günlük bir buzağı oluşturdu. Yapılan klinik muayenede; atresia ani, atresia vulva ve perineal bölgede yaklaşık 8x10x25 cm büyüklüğünde fluktuan bir kitle saptandı. Kitle sedasyon ve lokal infiltrasyon anestezisi eşliğinde cerrahi olarak ekstirpe edildi ve histopatolojik incelemede vagina mukozası ile uyumlu non-keratinize çok katlı yassı epitelyum belirlendi. Postoperatif dönemde hayvanın sorunsuz bir şekilde defekasyon ve ürinasyonunu yaptığı belirlendi. Sonuç olarak; bu olgu sunumu ile benzer vakalar açısından klinik pratiğe ve literatüre katkı sağlanacağı düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Atresia ani, Atresia vulva, Kloaka oluşumu, Buzağı.

### Multi Urogenital System Anomalies in a Simmental Calf

**Abstract:** The purpose of this case presentation was to describe multi organ anomalies, including atresia ani and vulva, cloacal formation, vaginal ectopy, and coccygeal agenesis, in urogenital system of a calf, and to evaluate the results of the treatment. The case material was a 2-day old Simmental calf brought to the clinic with complaints of a mass at the perineal area and the lack of tail. Clinical examination revealed atresia ani, atresia vulva and a fluctuant mass sizing 8x10x25 cm at the perineal region. Under sedation and local infiltration anesthesia, the mass was surgically extirpated and in histopathological examination it was determined non-keratinized stratified squamous epithelium, which complies with the vaginal mucosa histomorphology. In follow up, the animal was seen to defecate and urinate with no problems. In conclusion, the present case contributes to clinical practice and to the literature in terms of similar cases.

**Keywords:** Atresia ani, Atresia vulva, Cloacal Formation, Calf.

### Giriş

Birçok evcil hayvan türünde farklı sistemlere ait anomalilerinin bir arada veya ayrı ayrı şekillenebileceği; bunlar arasında atresia ani, rektovaginal fistül, kolon agenezi yaygın olarak yer tutarken rektouretal fistül, agenesi ve ektopilerin daha nadir olarak görüldüğü rapor edilmiştir (Aslan ve ark., 2009; Belge ve ark., 2000; Durmuş ve Çınar, 2011; İşler ve ark., 2016; Kılıç ve ark., 2005; Kılıç ve ark., 2006; Şındak ve ark., 2010; Yayla ve ark., 2016). Ayrıca, birçok sistemi içine alan çoklu kongenital anomalilerin tek bir hayvanda görülebileceği de bilinmektedir (Doğan ve Şındak, 2013; Durmuş ve Çınar, 2011; Kılıç ve ark., 2006; Şındak ve ark., 2010). Kongenital anomalilerin nedenlerinin belirlenmesi her zaman mümkün olmamakla beraber çoğu zaman mutasyon, kromozomal defektler, viral veya bakteriyel enfeksiyon, intoksikasyon ve gebelikte yetersiz veya kötü beslenme ile ilişkilendirilmektedir. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde yapılan rektal palpasyon ya da diğer farklı çevresel faktörlerinde etkili olabileceği düşünülmektedir (Durmuş ve Çınar, 2011; Kılıç ve ark., 2005; Kılıç ve ark., 2006; Yayla ve ark., 2016). Özellikle çiftlik hayvanlarında tespit edilen anomali veya malformasyonların sağaltımında temel amaç; hayvanın yaşamını sürdürerek

kasaplık bir değere ulaşmasına katkı sağlamak yönünde olmaktadır (Kılıç ve ark., 2006, Kılıç ve ark., 2015).

Bu olgu sunumunda bir buzağıda karşılaşılan atresia ani, atresia vulva, kloaka oluşumu, vaginal ektopi ve koksigeal agenesiyi içeren çoklu ürogenital sistem anomalisinin tanımlanması ve uygulanan sağaltım sonuçlarının bir arada değerlendirilmesi amaçlandı.

### Olgu Tanımı

Olgumuzu kuyruk yokluğu ve perineal bölgede bir kitle şikâyeti ile Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı Kliniğine getirilen simental ırkı, 2 günlük bir buzağı oluşturdu (Şekil 1). Buzağının defekasyon veya ürinasyon yapmadığı, ancak kitlenin uç kısmının dışkı ile bulaşık olduğu ve buranın detaylı incelendiğinde toplu iğne başı büyüklüğünde bir fistül ağzının olduğu görüldü. Bu fistül deliğinin doğuştan mı yoksa sonradan mı oluştuğu yönünde gerek anamnez gerekse klinik muayene sonuçlarına göre kesin bir yargıya varılamadı.

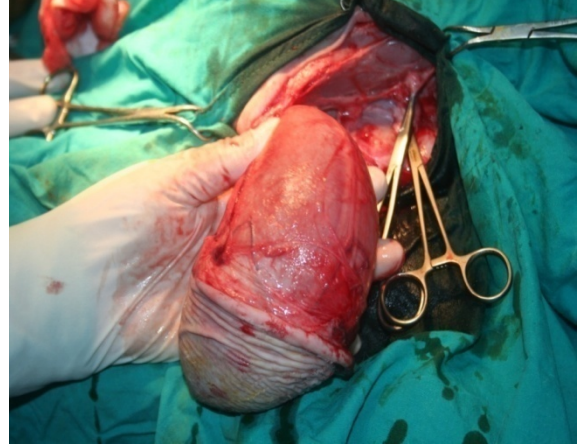
Yapılan klinik muayenede; koksigeal agenesi, atresia ani et vulva ve perineal bölgeden başlayıp inguinal bölgeye kadar uzanan ve bu bölgede geriye doğru dirseklenme gösteren yaklaşık 8x10x25 cm büyüklüğünde fluktuan bir kitle saptandı (Şekil 2). Bu kitlenin total olarak ekstirpe edilmesi kararlaştırılan olguda operasyon için sedasyon (0.2 mg/kg/intramusküler, xylazine HCl, Rompun®, Bayer) ve lokal infiltrasyon (20 ml, %2 lidokain HCl, Adokain®, Sanovel) anestezi tercih edildi. Traş-dezenfeksiyon ve bölgenin sınırlandırılması gibi rutin operasyon hazırlıklarını takiben kitlenin dip kısmına sirküler bir şekilde yapılan ensizyonla bölgeye ulaşıldı (Şekil 3). Operasyon sırasında kitlenin lümenli bir yapıda olduğu ve vagina olduğundan şüphe duyulan kesenin dorsalde rektum ile kloakal bir yapı şeklinde birleştiği görüldü. Kitle içeriğinin ise sulu kıvamından dolayı mekonyumla karışık idrar olabileceği yorumlandı. Asepsi ve antisepsi kurallarına gereken özen gösterilerek kitle içeriği bir böbrek küvet içerisine boşaltıldıktan sonra kese şeklindeki yapı ekstirpe edildi. Daha sonra dorsalde yer alan kloaka yapısına (Şekil 4) herhangi bir müdahalede bulunulmaksızın bölgede oluşan kitle yatağındaki kas ve deri karşı karşıya getirilerek bölge kapatıldı.



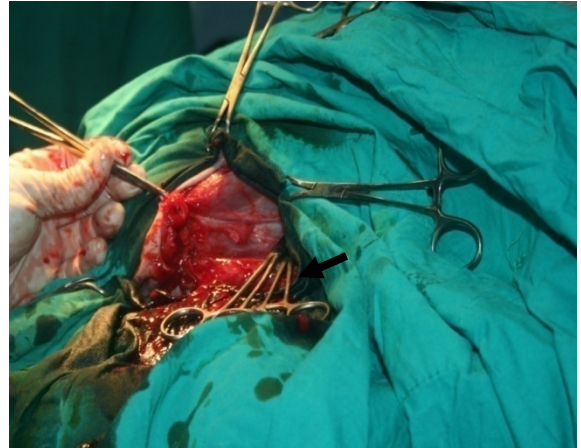
Şekil 1. Olgunun preoperatif görünümü.



Şekil 2. Kitlenin preoperatif görünümü.



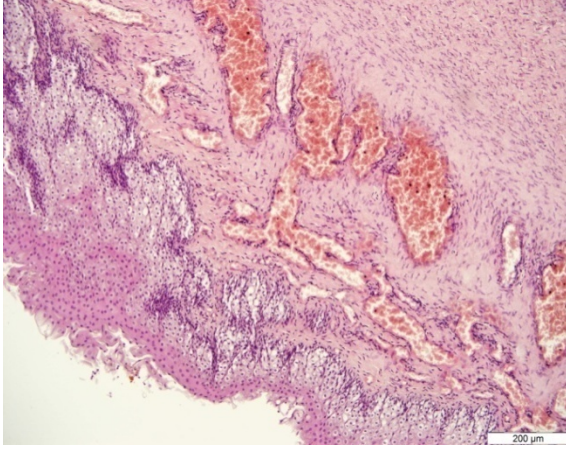
Şekil 3. Kitlenin operasyon sırasında görünümü.



Şekil 4. Kitle uzaklaştırıldıktan sonra kloakal yapı (siyah ok).



Şekil 5. Olgunun postoperatif görünümü.



**Şekil 6.** Doku örneğindeki non-keratinize çok katlı yassı epitelyum ve çok sayıda submukozal damar, hematoksilen eozin.

Postoperatif bir hafta süre ile antibiyoterapi ve yara bakımı yapıldı (10,000 IU benzilpenicillin prokain, 10 mg dihidrostreptomycin sulphate, Reptopen S, CEVA-DIF). Postoperatif dönemde hayvanın sorunsuz bir şekilde defekasyon ve ürinasyonunu bu kloakal yapıdan bazen bir arada bazen de ayrı ayrı yaptığı görüldü (Şekil 5). Daha sonra operasyondan sonraki ilk bir ay boyunca yapılan takiplerde buzağının normal gelişiminde aksama olmadığı ve genel durumunun iyi olduğu öğrenildi. Ekstirpe edilen kitleden alınan doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan kesitler Hematoksilen eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Histopatolojik bulgulara dayanarak kitlenin vagina mukozası ile uyumlu non-keratinize çok katlı yassı epitelden oluştuğu tespit edildi (Şekil 6).

## Tartışma ve Sonuç

Diğer bir çok hayvan türünde olduğu gibi buzağılarda da uretral stenosis, dilatasyon, divertikulum, atresia gibi ürogenital anomalilerin atresia ani, atresia ani et rekti ya da rektovaginal fistül ile birlikte görülebileceği farklı bir çok yazarca (Bademkiran ve ark., 2009; Durmuş ve Çınar 2011; İşler ve ark., 2016; Kılıç ve ark., 2005; Kılıç ve ark., 2015; Kılıç ve ark., 2006; Krishna ve ark., 2009; Shakoov ve ark., 2012; Şındak ve ark., 2010; Yayla ve ark., 2016) bildirilmiştir. Olgumuzda ise atresia ani, atresia vulva, kloaka oluşumu, vaginal ektopi ve koksigeal agenesiyi içeren çoklu ürogenital sistem anomalisi olarak tanımlandı. Bu olguda ektopik vaginadan oluşan bir kese içerisinde kloakal kanaldan gelen dışkı ve idrar karışımı birikerek kitlenin zamanla büyüyen yaklaşık 8x10x25 cm hacmine ulaştığı düşünülmüştür. Operasyon sırasında vagina benzeri yapının vücudun dışında

ampül benzer bir kese şeklini aldığı ve perineal bölge düzeyinde idrarla dışkının karışımına bağlı olarak fluktuan bir kitleye dönüştüğü anlaşılmış, ancak vaginal yapı olarak yorumlanan bu organ normal lokalizasyonuna getirilememiştir. Yapılan histopatolojik incelemelerde bu kitleden alınan kesitlerin vagina mukozası ile uyumlu non-keratinize çok katlı yassı epitelden olduğu tespit edilmiş ve ektopik mega vagina tanısı konmuştur.

Sindirim sistemiyle birlikte çoğunlukla ürogenital sistemin de dahil olduğu çoklu anomali veya malformasyonların patogenezi tam olarak bilinmemekle birlikte genetik ve çevresel faktörleri de içine alan değişik birçok faktörün etkili olduğu düşünülmektedir (Aslan ve ark., 2009; Belge ve ark., 2000; Doğan ve Şındak, 2013; Durmuş ve Çınar, 2011; Kılıç ve ark., 2005; Kılıç ve ark., 2006; Şındak ve ark., 2010; Yayla ve ark., 2016). Nedenin saptanması birçok açıdan önemli olmasına rağmen sunulan bu olguda nedenin belirlenmesine yönelik imkânlar ölçüsünde herhangi bir girişimde bulunulmamıştır. Bu olguda hayvanın kasaplık bir değer kazanana kadar bile olsa normal yaşamını sürdürmesine yardımcı olunması amaçlandı ve uygulanan operasyonla buzağının ürinasyon ve defekasyon yaparak akranları gibi besi performansına ulaştığı anlaşılmıştır.

Sonuç olarak bu olgu sunumu ile simental ırkı iki günlük bir buzağıda karşılaşılan atresia ani, atresia vulva, kloaka oluşumu, vaginal ektopi ve koksigeal agenesiyi de içeren çoklu ürogenital sistem anomalisi tanımlanarak, vakanın raporlanması ile özellikle saha şartlarında çalışan meslektaşlarımıza benzer olguları değerlendirmede ışık tutacağı ve literatüre katkı sunacağı düşünülmüştür.

## Kaynaklar

- Aslan L, Karasu A, Gençcelep M, Bakır B, Alkan İ, 2009: Ruminantlarda konjenital anorektal anomali olgularının değerlendirilmesi. *YYÜ Vet Fak Derg*, 20, 1, 31-36.
- Belge A, Gönenci R, Biricik HS, Ormancı S, 2000: Buzağılarda doğmasal anomali olguları. *YYÜ Vet Fak Derg*, 11, 2, 23-26.
- Doğan H, Şındak N, 2013: Nizip ve köylerindeki buzağı, kuzu ve oğlaklarda anomalilerin insidansı ve bu olgularda bazı biyokimyasal değerlerin belirlenmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 2, 2, 61-66.
- Durmuş AS, Çınar HN, 2011: A case of rectovaginal fistula, atresia ani and perosomus elumbus in a calf. *FÜ Sag Bil Vet Derg*, 25, 1, 43-47.
- İşler CT, Altuğ ME, Gönenci R, Aytekin İ, 2016: Bir koyun işletmesinde görülen anomali vakalarının değerlendirilmesi. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 5, 1, 74-76.



Kılıç E, Öztürk S, Aksoy O, Özaydın I, Özba B, Dağ-Erginsoy S, 2005: Preputial aplasia, uretral diverticulum and distal uretral atrazia in kids. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 11, 1, 73-76.

Kılıç E, Özaydın İ, Aksoy O, Yayla S, Sözmén M, 2006: Multiple urogenital system anomalies in three calves. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 12, 2, 193-197.

Kılıç E, Baran V, Yayla S, Özen H, 2015: Bir tuj ırkı kuzuda atresia ani, atresia vulva ve rektovaginal fistül anomalisi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 12, 3, 219-222.

Krishna H, Prasad VD, Rao M, 2009: Agenesis of vulva and terminal urethra with atresia ani et recti in a buffalo calf. *Buffalo Bulletin*, 28, 4, 165-167.

Shakoor A, Muhammad SA, Younus M, Kashif M, 2012: Surgical repair of congenital recto-vaginal fistula with atresia ani in a cow calf. *Pak Vet J*, 32 (2), 298-300.

Şındak N, Şahin T, Biricik HS, 2010: Urethral dilatation, ectopic testis, hypoplasia penis, and phimosis in a kilis goat kid. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 16, 1, 147-150.

Yayla S, Kılıç E, Baran V, Özen H, 2016: A case of congenital rectourethral fistula, urethral dilatation and segmental urethral agenesis encountered in a calf. *Harran Üniv Vet Fak Derg*, 5, 1, 70-73.

\*\* : Bu olgu sunumu "XV. Ulusal Veteriner Cerrahi Kongresi I. Uluslararası Türkiye Veteriner Cerrahi Kongresinde" poster olarak sunulmuştur.

**\*Yazışma Adresi:** Sadık YAYLA  
Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Cerrahi Anabilim Dalı, Kars, Türkiye.  
e-mail: sadikyayla@gmail.com

# Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment in a Dog with Heavily Injured Tail due to Tail Chasing Behavior

Duygu DALĞIN<sup>1\*</sup>, Yücel MERAL<sup>1</sup>, Taylan ÖNYAY<sup>2</sup>, Metin ÇENESİZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, Samsun, Turkey.

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Samsun, Turkey.

<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Samsun, Turkey.

Received Date: 21.02.2017

Accepted Date: 12.04.2017

**Abstract:** This case report presents the clinical healing success of PRP application in a 2 years old male Kangal dog with tail chasing syndrome which chewed and snapped part of its tail and resulted with a devitalized, necrotized and inflamed severe complex wound. PRP is an easily applied, autologous, relatively cheap and efficient regenerative method. This report aims to point out the benefits of this rapid and efficient method in wide, non-healing wounds due to localization or other reasons.

**Keywords:** Platelet rich plasma (PRP), Dog, Tail, Wound.

## Bir Köpekte Kuyruk Yakalama Davranışına Bağlı Olarak Oluşan Kuyruk Yaralanmasında

### Trombositçe Zengin Plazma (TZP) Uygulaması

**Özet:** Bu raporda kuyruk yakalama davranışsal bozukluğuna bağlı olarak, kendi kuyruğunu parçalayarak, bir kısmının kopmasına neden olmuş, kalan kısmında da devitalize, nekrotik, yangılı ve kompleks bir yara oluşan 2 yaşındaki erkek bir Kangal köpekte PRP uygulamasıyla erişilen başarılı klinik iyileşme süreci sunulmaktadır. PRP kolay uygulanan, otolog, nispeten ucuz ve etkin bir rejeneratif tedavi yöntemidir. Bu olgu, geniş alanlı, iyileşmede lokalizasyon ve diğer nedenlere bağlı güçlük yaşanan yaralarda hızlı ve başarılı sonuçlar veren bu yönteme dikkat çekmek amacıyla sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Trombositçe zengin plazma (TZP), Köpek, Kuyruk, Yara.

## Introduction

Tail chasing is a behavioral problem observed in dogs, usually having a compulsive etiology. However, displacement behavior, epileptic episodic behavior, neuropathologic disorders, psychotic or hallucinatory disorders or acrodermatitis all may be underlying disorders and must certainly be concerned (Landsberg et al., 2003). Conditions triggering the action are boredom, past injury or trauma, attention seeking, genetic (Bull Terriers and German Shepherds), confinement, physical abuse and separation (Hartigan, 2000). Management of the problem includes behavioral modification regarding identification of the etiology, elimination of predisposing factors and breaking the habit, desensitization or counterconditioning and pharmaceutical intervention with naltrexone, risperidone, clomipramine or fluoxetine (Landsberg et al., 2003; Yalcin, 2010). In some cases, tail chasing results with violent injuries of the tail, usually with complicated ulcerations, necrosis and suppuration. In this situation, wound has the major priority. Conventional wound management is the first step, but rapid regeneration is desired considering the complexity of the situation and vulnerable location of the wound.

Platelet rich plasma (PRP), is described as a high concentrated plasma solution obtained from

the patient's own blood. There are three types of granules in platelets which include platelet-derived growth factors (PDGF), transform growth factor beta (TGFb 1 and 2), epithelial growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), 300 different proteins (Textor, 2014) and bioactive factors (Foster et al., 2009). These factors modulate cell proliferation, differentiation, angiogenesis and chemotaxis. PRP is included within regenerative medicine area in the last 10 years (Sanches-Gonzales et al., 2012). In this case, a therapeutic approach with PRP in a tail injury is reported.

## Case History

A 2 years old intact male Kangal dog with tail chasing behavioral problem was referred to our clinics in June 2016. Drug therapy together with behavioral modification techniques and conventional therapy for the dermatitis of the tail were prescribed in detail. 8 months later, the dog was re-emerged with a terrible clinical presentation. The owners denoted that following the previous referral, they applied the prescriptions for a month and got favorable results, but then they decided to leave the dog to one of their relatives in

the village aiming to provide more freedom to the dog. However they learned that the new owner tied the dog most of the day and the dog ate his own tail, lost a considerable amount of weight and presented substantial aggression.

The clinical situation required urgent attention to the tail (Figure 1). The patient was presented with multiple infected wounds on its tail inflicted due to constant gnawing. Tissue loss was extensive close to tip of the tail, exposing the last 2 coccygeal vertebrae. Another, 3x2cm wound was present at the dorsum of the tail. All wounds were class 4 (dirty- contaminated) avulsions (Pavletic, 2010). The patient was in considerable pain, so clipping of the tail hair and initial treatment was performed under general anaesthesia (Propofol, 6mg/kg, I.V., bolus administration as required for 30 minutes), in addition intravenous regional anaesthesia (Lidocain, 2%, 1ml to the median coccygeal vein while a garrote was applied to the tail base) and meloxicam (0.2mg/kg, I.V.) for pain management. The devitalized skin tissue at the tail tip and last two coccygeal vertebrae were removed and remaining wounds were debrided aggressively with wet gauze. Following the procedure, freshly prepared PRP was administered to the margins of the wound.

PRP preparation was achieved by PRP kit (3E PRP Pervice Kit) with 1.5 ACD-A anticoagulant and 8.5 ml venous blood according to the manufacturer's instructions. Following centrifugation at 3000 rpm/5 min, PRP at the top of the solution was removed with an insulin syringe. Obtained 0.5 ml product was examined at the microscope with haemocytometric method and an effective number of 1250000 platelet/ $\mu$ L was counted (Textor, 2014). Then application was performed (Figure 2). Risperidone (Risperdal oral solution 1mg/1ml, 100 ml - Eczacıbaşı) was used SID based on 1 mg/m<sup>2</sup> dose for the behavioral disorder resulting with gradual clinical progress in a month. Amoxycillin trihydrate (Largopen 1 tablet, BİLİM ilaç, 30 mg/kg/SID, 7 days) was prescribed for bacterial interference, with nitrofurazone (Furacin pomad-Zentiva) and St. John's Wort oil topically for wound care. Also Elisabethan collar was advised to preserve the wounded area. A week later, wound presented a favorable regeneration (Figure 3) with significant improvement in behavior and the dog gained 4 kg within a week due to the normalization of the appetite. PRP created a satisfactory and rapid regeneration in the present case.

## Discussion

PRP is widely used in clinical practice due to its autologous structure restraining immune reactions, availability, easy and fast application procedure,

relatively less expense and high efficiency. Though it is newly considered in veterinary practice, satisfactory results are reported in dogs and horses for osteoarthritis (Bosch et al., 2010; Franklin and Cook, 2013), dental implants (Streckbein et al., 2013), bone defects (Jeong et al., 2013) and wound healing (Karayannopoulou et al., 2015).



Figure1 (A,B). Clinical presentation of the tail at referral.

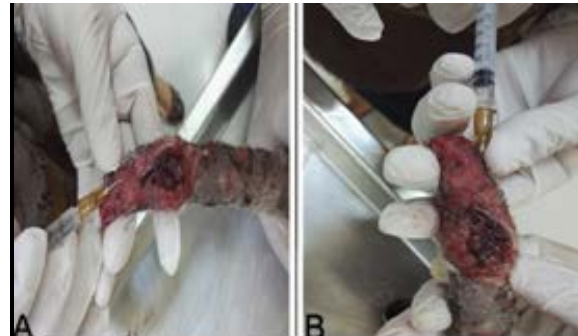


Figure2 (A,B). PRP application.



Figure3 (A,B). Regeneration one week later.

Cutaneous wound healing is a matter of balance between matrix elements and growth factors and is dependent on multiple variables, including blood supply, defect size, tension, and mobility that affect the rates of healing and residual scarring (Diegelmann and Evans, 2004). Platelet rich plasma (PRP) not only enhances wound healing but also helps regenerate skin tissue (Carter et al., 2003). Sardari et al. (2011) concluded that PRP is an important source of growth factors for wound healing. In addition there are a few studies illustrating the effectiveness of autologous PRP in

treatment of chronic wounds on the tail of a dog (Kim et al., 2009; Mehrjerdi et al., 2008) and surprisingly the favorable results of allogeneic PRP (because of dehydration, concurrent systemic disorder and the very small dimensions of the dog) on the hip and tail wound lesions in a miniature pincher (Chung et al., 2015). Similarly, clinical output of PRP in the present case was satisfactory with rapid healing. This demonstrates the efficiency of PRP in critical wounds, especially in inconvenient parts of body or concordant systemic or behavioral disorders.

## References

- Bosch G, Van Schie HTM, Groot MW, 2010: Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: A placebo-controlled experimental study. *Journal of Orthopaedic Research*, 28, 211-217.
- Carter CA, Jolly DG, Worden Sr CE, Hendren DG, Kane CJ, 2003: Platelet-rich plasma gel promotes differentiation and regeneration during equine wound healing. *Exp Mol Pathol*, 74, 244.
- Chung T, Baek D, Kim N, Park J, Park C, 2015: Topical allogeneic platelet-rich plasma treatment for a massive cutaneous lesion induced by disseminated intravascular coagulation in a toy breed dog. *Ir Vet J*, 68,1-4.
- Diegelmann RF, Evans MC, 2004: Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci*, 9, 283.
- Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, 2009: Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 37, 2259-2265.
- Franklin SP, Cook JL, 2013: Autologous conditioned plasma versus hyaluronan plus corticosteroid for treatment of chronic elbow osteoarthritis in dogs. *Can Vet J*, 54, 881-884.
- Hartigan JP, 2000: Compulsive tail chasing in the dog: A mini-review. *Irish Veterinary Journal*, 53, 261-264.
- Jeong K, Kim SG, Lee JS, 2013: Effect of Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin on Peri-Implant Bone Defects in Dogs. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 535-537.
- Karayannopoulou M, Psalla D, Kazakos G, 2015: Effect of locally injected autologous platelet-rich plasma on second intention wound healing of acute full-thickness skin defects in dogs. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 3, 172-178.
- Kim JH, Park C, Park HM, 2009: Curative effect of autologous platelet-rich plasma on a large cutaneous lesion in a dog. *Vet Dermatol*, 20, 123-126.
- Landsberg GM, Hunthausen W, Ackerman L, 2003: Handbook of behavior problems of the dog and cat. Second Edition. Saunders, Elsevier Health Sciences, Missouri.
- Pavletic M, 2010: Atlas of small animal wound management and reconstructive surgery (3rd ed.), Chapter 3, Basic principles of wound management, 31-43.
- Sanchez-Gonzalez DJ, Mendez-Bolina E, Trejo-Bahena NI, 2012: Platelet-rich plasma peptides: key for regeneration. *Int J Pept*, 3, 532-519.
- Sardari K, Emami MR, Kazemi H, Movasagi AR, Goli AA, Lotfi A, Malekzadeh S, 2011: Effects of platelet rich plasma (PRP) on cutaneous regeneration on wound healing in dogs treated with dexamethasone. *Comp Clin Pathol*, 20, 155-162.
- Streckbein P, Kleis W, Buch RSR, 2014: Bone Healing with or without Platelet-Rich Plasma around Four Different Dental Implant Surfaces in Beagle Dogs. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 16, 479-486.
- Textor J, 2014: Platelet-Rich Plasma (PRP) as a Therapeutic Agent: Platelet Biology, Growth Factors and a Review of the Literature In: Platelet-Rich Plasma Regenerative Medicine: Sports Medicine, Orthopedics and Recovery of Musculoskeletal Injuries, Lana, J.F.S.D., Santana, A, Belangero, D., Luzo, M (Eds). XVII, Springer Pub.
- Yalcin E, 2010: Comparison of clomipramine and fluoxetine treatment of dogs with tail chasing. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*, 38, 295-299.

**\*Corresponding Author:** Duygu DALĞIN  
Ondokuz Mayıs University,  
Faculty of Veterinary Medicine,  
Department of Internal Diseases, Samsun, Turkey.  
e-mail: duygu@omu.edu.tr

## Nöroprotektif Etkili Bir Flavonoid: Nobiletin

Gül Fatma YARIM<sup>1</sup>, Metin ÇENESİZ<sup>2</sup>, Murat YARIM<sup>3</sup>, Sena ÇENESİZ<sup>1</sup>, Filiz KAZAK<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>3</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>4</sup>Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.

Geliş Tarihi: 29.11.2016

Kabul Tarihi: 16.12.2016

**Özet:** Nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde flavonoidlerin kullanımı yeni umutlar vaat etmektedir. Nobiletin, narenciye kabuklarında bulunan bir polimetoksi flavonoiddir. Nobiletinin nöroprotektif etkiye sahip olduğu pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırma ile ortaya konulmuştur. Nobiletin, öğrenme ve hafıza ile ilişkili sinyalizasyon kaskadlarını etkilemekte, enflamasyon mediyatörlerini modüle ederek nörodejenerasyonu hafifletmekte, dopamin salınımını artırarak motor ve bilişsel işlev bozukluğunu engellemekte, duygusal ve yenilikleri tanıma belleğini geliştirmektedir. Güncel çalışmalar, nobiletinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu desteklemektedir. Bu derlemede, nobiletinin nöroprotektif etkileri üzerinde durularak, literatürden elde edilen sonuçlar özetlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Flavonoid, Nobiletin, Nöroprotektif.

### A Flavonoid has Neuroprotective Effect: Nobiletin

**Abstract:** The use of flavonoids promises new approach for the treatment of neurodegenerative diseases. Nobiletin is a polymethoxy flavonoid found in the citrus peel. The neuroprotective effect of nobiletin has been demonstrated *in vivo* and *in vitro*. Nobiletin affects the signaling cascades associated with learning and memory, alleviates neurodegeneration by modulating inflammatory mediators, inhibits motor and cognitive dysfunction by increasing dopamine release and enhances memory and recognition of emotions and innovations. Recent studies suggest that nobiletin has the potential to be a new drug for the treatment of neurodegenerative diseases. In this review, the neuroprotective effects of nobiletin was emphasized and the results obtained from the literature were summarized.

**Keywords:** Flavonoid, Nobiletin, Neuroprotective.

### Giriş

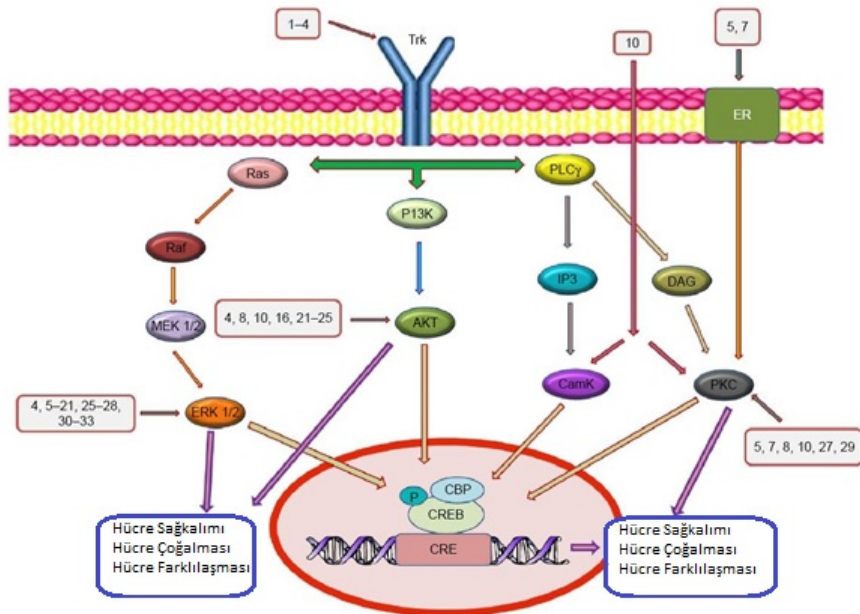
Son yıllarda, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi konusundaki bilimsel çalışmalar nöroprotektif etkili flavonoidlerin kullanımına yoğunlaşmaktadır. Flavonoidlerin, nörodejenerasyon modellerinde enflamasyon mediyatörlerini modüle ederek nörodejenerasyonu engellediği ya da hafiflettiği ileri sürülmektedir (Choi ve ark., 2014; Cui ve ark., 2014; Jung ve ark., 2014; Kim ve ark., 2012; Lee ve ark., 2014; Li ve ark., 2013; Schroeter ve ark., 2001; Vafeiadou ve ark., 2009; Vauzour ve ark., 2008). Çeşitli polifenollerin nörotrofik etkilerine aracılık eden ana sinyal yolları Şekil 1'de sunulmuştur (Moosavi ve ark., 2015). Nörotrofik sinyalizasyon, Trk reseptörlerinin aktivasyonu ile Ras/MAPK, PI3K/Akt ve PL-Cy yolları aracılığıyla başlamaktadır. Polifenollerle Trk bağlanması, bu reseptörlerin otofosforilasyonunu ve aktivasyonunu sağlamaktadır. Reseptör fosforilasyonu, reseptörü MAPK, PI3K ve fosfolipaz Cy (PLCy1) yollarına bağlayan adaptör bağlama bölgelerini oluşturarak CREB proteininin fosforilasyonuna yol açmaktadır. CBP'ye bağlı fosforile CREB, CRE'ye bağlanarak hedef genlerin kopyalanmasına neden olmaktadır. Bu genler sağkalım, farklılaşma, büyüme, sinaptik

plastisite ve uzun süreli bellek ile ilgilidir (Moosavi ve ark., 2015).

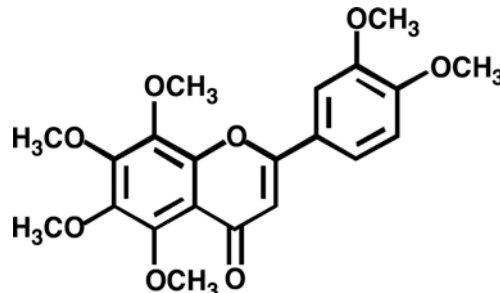
Nobiletin (3',4',5,6,7,8-hekzametoksiflavon), molekül ağırlığı 402.399 g olan ve narenciye kabuklarında bulunan bir polimetoksi flavonoiddir (Horowitz ve Gentilli, 1977; Li ve ark., 2006; Nogata ve ark., 2006). Nobiletinin kimyasal yapısı Şekil 2'de sunulmuştur (Nakajima ve ark., 2007). Oral yolla uygulanan nobiletin kan-beyin bariyerini geçerek beyin dokusuna ulaşmaktadır. Ratlarda nobiletinin oral yolla 50 mg/kg tek dozda uygulanmasından 1 saat sonra plazma ve beyindeki maksimum konsantrasyonlarının sırasıyla 1.78 ve 4.20 µg/ml ve eliminasyon yarı ömrünün ise sırasıyla 1.80 ve 11.42 saat olduğu belirlenmiştir (Singh ve ark., 2011). Nobiletin, biyolojik etkilerini N-metil-D-aspartat reseptörü aracılığı ile göstermektedir (Huang ve ark., 2016). Nobiletinin nöroprotektif etkiye sahip olduğu pek çok *in vivo* ve *in vitro* araştırma ile ortaya konulmuştur. Nobiletin, nörotrofik etkisini cAMP/PKA/MEK/Erk/MAP kinaz yolağını aktive ederek göstermektedir (Nagase ve ark., 2005; Nakajima ve ark., 2007). Nobiletin, NMDA reseptörü ile ERK aktivitesini ve CREB transkripsiyonel aktivitesini artırabilmektedir. Nobiletin, PKA sinyal

yolağının modülasyonu ile DARPP-32 aktivitesini restore edebilmektedir. CREB transkripsiyonunu upregülasyonunu sağlayan  $Ca^{2+}/CaMKII$  sinyalizasyonu nobiletin tarafından uyarılmaktadır. Nobiletin, PI3K/Akt aktivitesini ve BDNF/TrkB sinyalizasyonunu ve PPAR $\gamma$  ekspresyonunu upregüle etmektedir. Nobiletin, Nrf2 sinyalizasyonu aracılığıyla insülin duyarlılığını artırmaktadır (Şekil 3) (Huang ve ark., 2016). Nobiletin dışında mirisitrin, silibinin ve naringin gibi flavonoidlerin de substansiya nigradaki dopaminerjik nöronal hücre kaybının önlenmesinde olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir (Jung ve ark., 2014; Leem ve ark., 2014; Kim ve ark., 2016). Naringenin, hesperidin ve bunların metabolitleri de dahil olmak üzere narenciyelerde bulunan flavonoidlerin kan beyin bariyerine nüfuz etme ve

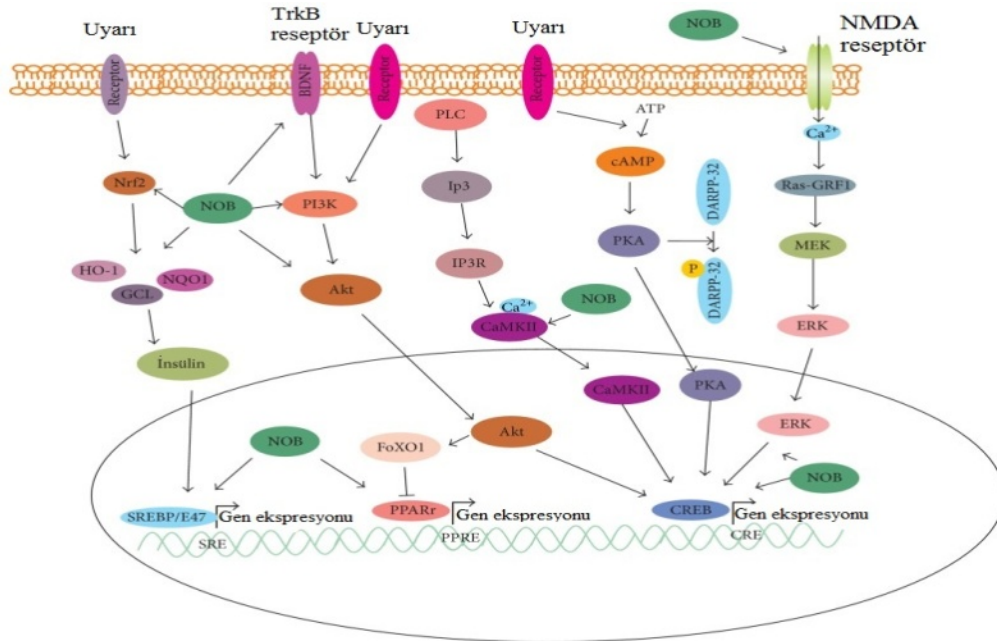
bu bariyeri geçme potansiyelleri bulunmaktadır (Youdim ve ark., 2004). Nobiletin, sadece kan beyin bariyerini geçmekle kalmamakta, aynı zamanda beyin dokusunda dolaşım ve periferik organlardan 3-4 kat daha yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir (Singh ve ark., 2011). Mandalina kabuğunda bulunan hesperidinin nobiletine göre miktarının fazla olmasına rağmen nobiletinin lipopolisakkarit ile indüklenen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ve IL-6 gibi proenflamatuar sitokinlerin salgılanmasını inhibe etmek için daha güçlü antiinflammatuar kapasiteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ho ve Kuo, 2014). Ayrıca, tangere-tin ile kıyaslandığında nobiletinin daha kuvvetli bir şekilde nitrik oksit üretimini engelleyici aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Choi ve ark., 2007; Ho ve Kuo, 2014).



**Şekil 1.** Çeşitli polifenollerin nörotrofik etkilerine aracılık eden ana sinyal yolları; 1: Epikateşin, 2: 7,8,3'-trihidroksiflavon, 3: diosmetin 4: 7,8-dihidroksifavon, 5: daidzein, 6: resveratrol, 7: hesperetin, 8: kurkuminoidler, 9: kafeik asit fenil ester, 10: ferulik asit, 11: baikalein, 12: apigenin, 13: honokiol, 14: nobiletin, 15: pinokembrin, 16: astilbin, 17: artepillin C, 18: 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoksiflavon, 19: 4'-O- $\beta$ -D-glikopiranozil-30,4- dimetoksikalkon, 20: fustin, 21: puerarin, 22: skutellarin, 23: oroksilin A, 24: metil 3,4-dihidroksibenzoat, 25: karnosik asit, 26: rosmarinik asit, 27: luteolin, 28: aurapten, 29: epigallokateşin 3 gallat, 30: icaritin, 31: likiritin, 32: fisetin, 33: rutin, CaMK,  $Ca^{2+}$ -kalmodulin kinaz; CREB, siklik adenosin monofosfat yanıt elementini bağlayıcı protein; CBP, CREB-bağlayıcı protein; DAG, diasilgliserol; ER, östrojen reseptörü; ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz; IP3, inositol trisfosfat; MAPK, mitojenle aktiflenen protein kinaz; MEK, Mitojenle aktive edilen protein kinaz kinazı; PI3K, fosfatidilinositol-3-kinaz; PKC, protein kinaz C; PLC $\gamma$ , fosfolipaz C-gama; Trk, tropomiyozin reseptör kinaz (Moosavi ve ark., 2015).



**Şekil 2.** Nobiletinin kimyasal yapısı (Nakajima ve ark., 2007).



Şekil 3. Nobiletinin hücrelerdeki sinyalizasyon kaskadları (Huang ve ark., 2016).

### Nobiletinin nöroprotektif etkisini gösteren *in vivo* çalışmalar:

Nobiletinin nöroprotektif etki gösterdiği pek çok *in vivo* araştırma ile kanıtlanmıştır. Nobiletinin farelerde N-metil-D-aspartat reseptör antagonizmi ile bağlantılı öğrenme yeteneklerinin azalmasını hücre dışı sinyal ile düzenlenen kinaz sinyal aktivasyonu ile hafiflettiği ortaya konulmuş ve bilişsel bozukluklarla karakterize nörolojik bozukluklar için terapötik ilaç geliştirme konusunda yeni bir yaklaşım olabileceği ifade edilmiştir (Nakajima ve ark., 2007). Nobiletinin yaşlı ratlarda izofluranla indüklenen bilişsel bozukluğu Akt, Bax, p-CREB ve BDNF'nin modülasyonu ile antioksidan, antiinflamatuar ve antiapoptotik etkiler göstererek iyileştirdiği ortaya konulmuştur (Bi ve ark., 2016). Kuprizonla indüklenen demiyelinasyon modelinde nobiletinin oligodendroglial hücreler üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, C57BL/6 farelere 3 hafta boyunca haftada 2 kez periton içi 50 mg/kg nobiletin uygulamasının olgun oligodendrositlerin belirteci olan proteolipit proteini karşı immuno-reaktiviteyi artırdığı ve nobiletin uygulamasının demiyelinasyonla seyreden multipl skleroz gibi hastalığı olan bireyler için uygun olabileceği ifade edilmiştir (Nakajima ve ark., 2015b).

Nobiletinin farelerde duygusal ve yenilikleri tanıma belleğini geliştirdiği rapor edilmiştir (Kang ve ark., 2016). Alzheimer hastalığı rat modelinde nobiletin uygulamasının beta amiloid engelli cAMP yanıt elemanı bağlayan proteininin (CREB) fosforilasyonunu sağlayarak hafıza kaybını engellediği rapor edilmiştir (Matsuzaki ve ark., 2006).

Alzheimer modeli oluşturulmuş transgenik farelerde 4 ay boyunca periton içi nobiletin uygulamasının hipokampustaki beta amiloid peptid yükünü ve plaklarını azalttığı belirlenmiştir (Onozuka ve ark., 2008). Yamamoto ve ark. (2009), nobiletinin beyin iskemisinin neden olduğu öğrenme ve hafıza bozukluğunu CaMKII ve CREB fosforilasyonunu uyararak giderdiğini ve nobiletinin Alzheimer tedavisi için yeni ve öncü bir bileşik olabileceğini ifade etmişlerdir. Yaşa bağlı bilişsel bozulmanın yanı sıra Alzheimer hastalığı ile ilgili nöropatolojinin önlenmesinde, beta amiloid oligomer düzeylerinin azaltılmasında, tau hiperfosforilasyonu ve oksidatif stresin baskılanmasında nobiletinin yararlı etkileri bildirilmiştir (Nakajima ve ark., 2013; 2015a).

Serebral iske mi rat modelinde periton içi nobiletin uygulamasının Nrf2 ve HO-1 ekspresyonlarını artırarak ve NF- $\kappa$ B ekspresyonunu azaltarak nörolojik bozukluk ve beyin ödemi hafiflettiği rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Nobiletinin ratlarda serebral iske mi-reperfüzyon hasarına bağlı gelişen infarkt hacmini ve beyin ödemi önemli ölçüde azalttığı, motor fonksiyon bozukluklarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Yasuda ve ark., 2014). Serebral orta arter oklüzyonu oluşturulan ratlarda, nobiletinin p-Akt, p-CREB, BDNF ve Bcl-2 yollarını aktive ederek ve kan-beyin bariyeri geçirgenliğini düzelterek serebral iske miye karşı beyini koruduğu rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2013). Yabuki ve ark. (2014), Parkinson modeli oluşturdukları farelerde nobiletinin beyinde dopamin salınımını artırarak, motor ve bilişsel işlev bozukluğunu engellediğini ortaya koymuşlardır. Nobiletinin ratlarda oluşturulan deneysel Parkinson

hastalığı modelinde, substansiya nigrada bulunan dopaminerjik nöronları, mikroglial aktivasyonu engelleyerek ve gliyal hücre kaynaklı nörotrofik faktör ekspresyonunu artırarak koruduğu anlaşılmıştır (Jeong ve ark., 2015).

#### Nobiletinin nöroprotektif etkisini gösteren *in vitro* çalışmalar:

Mikroglia hücre kültüründe, hipokampal nöron kültüründe ve rat feokromasitoma hücre hattında gerçekleştirilen çalışmalar, nobiletinin nöroprotektif etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Lipopolisakkaritle uyarılmış BV-2 mikroglia hücre kültürü modelinde nobiletinin, ERK, JNK, p38 MAPKs ve NF-κB sinyal yollarını inhibe ederek aşırı mikroglial aktivasyonu baskıladığı bildirilmiştir (Cui ve ark., 2010). Nobiletinin *in vitro* LPS ile indüklenen pro-enflamatuar NO, TNF-α, IL-1β ve IL-6 sekresyonunu azalttığı rapor edilmiştir (Ho ve Kuo, 2014). Nobiletinden zengin mandalina kabuğu ekstraktının hipokampal nöron kültüründe öğrenme ve hafıza ile ilişkili cAMP/PKA/ERK/CREB sinyalizasyonunu uyardığı rapor edilmiştir (Kawahata ve ark., 2013). Hipokampal nöron kültüründe nobiletin uygulamasının alfa-amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit resöptörünün protein kinaz A-aracılı fosforilasyonunu artırarak nörotrofik etki gösterdiği ileri sürülmüştür (Matsuzaki ve ark., 2008).

Oligodendrositlerin büyüme ve sağkalımında fosfatidilinositol 3-kinaz ve mitojen-aktive eden protein kinaz yollarının aktivasyonu rol oynamaktadır (Hiraiwa ve ark., 1997; Vemuri ve McMorris, 1996). Nobiletinin cAMP / PKA / MEK / Erk / MAP kinaz yolağını aktive ederek nörotrofik etki gösterdiği belirlenmiştir (Nagase ve ark., 2005). Cho ve ark. (2015), nobiletinin HT22 nöronlarını hidrojen peroksit kaynaklı hücre ölümüne karşı mitojen-aktive protein kinazlar ve apoptotik yollar aracılığıyla koruduğunu bildirmişlerdir. Hidrojen peroksit maruz bırakılan PC12 hücre hattında nobiletin uygulamasının hücre ölümünü ve kaspaz-3 aktivitesini inhibe ettiği, membran hasarını önlediği, ROS oluşumunu azalttığı ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalmasını hafiflettiği anlaşılmıştır (Lu ve ark., 2010). Araştırmacılar, hidrojen peroksit ile indüklenen sitotoksiteye karşı nobiletinin nöroprotektif etkili olduğunu ve diyetle alınacak bu antioksidanın nörodejeneratif hastalıklar için potansiyel aday olduğunu ileri sürmüşlerdir.

#### Sonuç

Nöroprotektif etkili flavonoidler, nörodejeneratif hastalıkların profilaksisinde ve tedavisinde başarı sağlamaktadır. Nöroprotektif etkili bir flavonoid olan nobiletin, bilişsel aktiviteyi artırıcı etkisiyle ön plana çıkmaktadır. Nobiletin, nörodejenerasyon modellerinde enflamasyon mediyatörlerini modüle ederek nörodejenerasyonu engellemek ya da hafifletmek amaçlı kullanım alanı bulmaktadır. Bilimsel çalışmalar, doğal bir flavonoid olan nobiletinin nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için yeni bir ilaç olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

#### Kaynaklar

- Bi J, Zhang H, Lu J, Lei W, 2016: Nobiletin ameliorates isoflurane-induced cognitive impairment via antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects in aging rats. *Mol Med Rep*, 14, 6, 5408-5414.
- Cho HW, Jung SY, Lee GH, Cho JH, Choi IY, 2015: Neuroprotective effect of *Citrus unshiu* immature peel and nobiletin inhibiting hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HT22 murine hippocampal neuronal cells. *Pharmacogn Mag*, 11, Suppl 2, 284-289.
- Choi SY, Ko HC, Ko SY, Hwang JH, Park JG, Kang SH, Han SH, Yun SH, Kim SJ, 2007: Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biol Pharm Bull*, 30, 4, 772-778.
- Choi SM, Kim BC, Cho YH, Choi KH, Chang J, Park MS, Kim MK, Cho KH, Kim JK, 2014: Effects of flavonoid compounds on β-amyloid-peptide-induced neuronal death in cultured mouse cortical neurons. *Chonnam Med J*, 50, 2, 45-51.
- Cui Y, Wu J, Jung SC, Park DB, Maeng YH, Hong JY, Kim SJ, Lee SR, Kim SJ, Kim SJ, Eun SY, 2010: Anti-neuroinflammatory activity of nobiletin on suppression of microglial activation. *Biol Pharm Bull*, 33, 11, 1814-1821.
- Cui QJ, Wang LY, Wei ZX, Qu WS, 2014: Continual naringin treatment benefits the recovery of traumatic brain injury in rats through reducing oxidative and inflammatory alterations. *Neurochem Res*, 39, 7, 1254-1262.
- Hiraiwa M, Taylor EM, Campana WM, Darin SJ, O'Brien JS, 1997: Cell death prevention, mitogen-activated protein kinase stimulation, and increased sulfatide concentrations in Schwann cells and oligodendrocytes by prosaposin and prosaptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 9, 4778-4781.
- Ho SC, Kuo CT, 2014: Hesperidin, nobiletin, and tangeretin are collectively responsible for the anti-neuroinflammatory capacity of tangerine peel (*Citri reticulatae pericarpium*). *Food Chem Toxicol*, 71, 176-182.



- Horowitz RM, Gentili B, 1977: Flavonoid constituents of citrus. In: Nagy S, Shaw PE, Veldhuis MK, editors. CT: Avi Publishing Company Inc., Citrus Science and Technology, Westport.
- Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, Wu L, 2016: The Multifunctional Effects of Nobiletin and Its Metabolites *In Vivo* and *In Vitro*. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2918796.
- Jeong KH, Jeon MT, Kim HD, Jung UJ, Jang MC, Chu JW, Yang SJ, Choi IY, Choi MS, Kim SR, 2015: Nobiletin protects dopaminergic neurons in the 1-methyl-4-phenylpyridinium-treated rat model of Parkinson's disease. *J Med Food*, 18, 4, 409-414.
- Jung UJ, Jeon MT, Choi MS, Kim SR, 2014: Silibinin attenuates MPP<sup>+</sup>-induced neurotoxicity in the substantia nigra *in vivo*. *J Med Food*, 17, 5, 599-605.
- Kang J, Shin JW, Kim YR, Swanberg KM, Kim Y, Bae JR, Kim YK, Lee J, Kim SY, Sohn NW, Maeng S, 2016: Nobiletin improves emotional and novelty recognition memory but not spatial referential memory. *J Nat Med*, 71, 1, 181-189.
- Kawahata I, Yoshida M, Sun W, Nakajima A, Lai Y, Osaka N, Matsuzaki K, Yokosuka A, Mimaki Y, Naganuma A, Tomioka Y, Yamakuni T, 2013: Potent activity of nobiletin-rich Citrus reticulata peel extract to facilitate cAMP/PKA/ERK/CREB signaling associated with learning and memory in cultured hippocampal neurons: identification of the substances responsible for the pharmacological action. *J Neural Transm (Vienna)*, 120, 10, 1397-1409.
- Kim HG, Ju MS, Ha SK, Lee H, Lee H, Kim SY, Oh MS, 2012: Acacetin protects dopaminergic cells against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neuroinflammation *in vitro* and *in vivo*. *Biol Pharm Bull*, 35, 8, 1287-1294.
- Kim HD, Jeong KH, Jung UJ, Kim SR, 2016: Myricitrin ameliorates 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra of mouse brain. *J Med Food*, 19, 4, 374-382.
- Lee E, Park HR, Ji ST, Lee Y, Lee J, 2014: Baicalein attenuates astroglial activation in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyridine-induced Parkinson's disease model by downregulating the activations of nuclear factor- $\kappa$ B, ERK, and JNK. *J Neurosci Res*, 92, 1, 130-139.
- Leem E, Nam JH, Jeon MT, Shin WH, Won SY, Park SJ, Choi MS, Jin BK, Jung UJ, Kim SR, 2014: Naringin protects the nigrostriatal dopaminergic projection through induction of GDNF in a neurotoxin model of Parkinson's disease. *J Nutr Biochem*, 25, 7, 801-806.
- Li S, Yu H, Ho CT, 2006: Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed Chromatogr*, 20, 1, 133-138.
- Li R, Liang T, Xu L, Zheng N, Zhang K, Duan X, 2013: Puerarin attenuates neuronal degeneration in the substantia nigra of 6-OHDA-lesioned rats through regulating BDNF expression and activating the Nrf2/ARE signaling pathway. *Brain Res*. 1523, 1-9.
- Lu YH, Su MY, Huang HY, Lin-Li, Yuan CG, 2010: Protective effects of the citrus flavanones to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. *Neurosci Lett*, 484, 1, 6-11.
- Matsuzaki K, Yamakuni T, Hashimoto M, Haque AM, Shido O, Mimaki Y, Sashida Y, Ohizumi Y, 2006: Nobiletin restoring beta-amyloid-impaired CREB phosphorylation rescues memory deterioration in Alzheimer's disease model rats. *Neurosci Lett*, 400, 3, 230-234.
- Matsuzaki K, Miyazaki K, Sakai S, Yawo H, Nakata N, Moriguchi S, Fukunaga K, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y, 2008: Nobiletin, a citrus flavonoid with neurotrophic action, augments protein kinase A-mediated phosphorylation of the AMPA receptor subunit, GluR1, and the postsynaptic receptor response to glutamate in murine hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 578, 194-200.
- Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O, 2015: Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des Devel Ther*, 10, 23-42.
- Nagase H, Yamakuni T, Matsuzaki K, Maruyama Y, Kasahara J, Hinohara Y, Kondo S, Mimaki Y, Sashida Y, Tank AW, Fukunaga K, Ohizumi Y, 2005: Mechanism of neurotrophic action of nobiletin in PC12D cells. *Biochemistry*, 44, 42, 13683-13691.
- Nakajima A, Yamakuni T, Matsuzaki K, Nakata N, Onozuka H, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Ohizumi Y, 2007: Nobiletin, a citrus flavonoid, reverses learning impairment associated with N-methyl-D-aspartate receptor antagonism by activation of extracellular signal-regulated kinase signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 321, 2, 784-790.
- Nakajima A, Aoyama Y, Nguyen TT, Shin EJ, Kim HC, Yamada S, Nakai T, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Ohizumi Y, Yamada K, 2013: Nobiletin, a citrus flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse. *Behav Brain Res*, 250, 351-360.
- Nakajima A, Aoyama Y, Shin EJ, Nam Y, Kim HC, Nagai T, Yokosuka A, Mimaki Y, Yokoi T, Ohizumi Y, Yamada K, 2015a: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves cognitive impairment and reduces soluble A $\beta$  levels in a triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease (3XTg-AD). *Behav Brain Res*, 289, 69-77.
- Nakajima M, Shimizu R, Furuta K, Sugino M, Watanabe T, Aoki R, Okuyama S, Furukawa Y, 2015b: Nobiletin induces oligodendrocyte lineage precursor cells in a cuprizone-administered demyelination animal model. *J Mult Scler (Foster City)*, 24, 1-6.
- Nogata Y, Sakamoto K, Shiratsuchi H, Ishii T, Yano M, Ohta H, 2006: Flavonoid composition of fruit tissues of citrus species. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 1, 178-192.
- Onozuka H, Nakajima A, Matsuzaki K, Shin RW, Ogino K, Saigusa D, Tetsu N, Yokosuka A, Sashida Y, Mimaki Y, Yamakuni T, Ohizumi Y, 2008: Nobiletin, a citrus flavonoid, improves memory impairment and Abeta pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 326, 3, 739-744.
- Schroeter H, Spencer JP, Rice-Evans C, Williams RJ, 2001: Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *Biochem J*, 358 (Pt 3), 547-557.

- Singh SP, Wahajuddin, Tewari D, Patel K, Jain GK, 2011: Permeability determination and pharmacokinetic study of nobiletin in rat plasma and brain by validated high-performance liquid chromatography method. *Fitoterapia*, 82, 8, 1206-1214.
- Vafeiadou K, Vauzour D, Lee HY, Rodriguez-Mateos A, Williams RJ, Spencer JP, 2009: The citrus flavanone naringenin inhibits inflammatory signalling in glial cells and protects against neuroinflammatory injury. *Arch Biochem Biophys*, 484, 1, 100-109.
- Vauzour D, Vafeiadou K, Rodriguez-Mateos A, Rendeiro C, Spencer JP, 2008: The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes Nutr*, 3 (3-4), 115-126.
- Vemuri GS, McMorris FA, 1996: Oligodendrocytes and their precursors require phosphatidylinositol 3-kinase signaling for survival. *Development*, 122, 8, 2529-2537.
- Yabuki Y, Ohizumi Y, Yokosuka A, Mimaki Y, Fukunaga K, 2014: Nobiletin treatment improves motor and cognitive deficits seen in MPTP-induced Parkinson model mice. *Neuroscience*, 259, 126-141.
- Yamamoto Y, Shioda N, Han F, Moriguchi S, Nakajima A, Yokosuka A, Mimaki Y, Sashida Y, Yamakuni T, Ohizumi Y, Fukunaga K, 2009: Nobiletin improves brain ischemia-induced learning and memory deficits through stimulation of CaMKII and CREB phosphorylation. *Brain Res*, 1295, 218-229.
- Yasuda N, Ishii T, Oyama D, Fukuta T, Agato Y, Sato A, Shimizu K, Asai T, Asakawa T, Kan T, Yamada S, Ohizumi Y, Oku N, 2014: Neuroprotective effect of nobiletin on cerebral ischemia-reperfusion injury in transient middle cerebral artery-occluded rats. *Brain Res*, 1559, 46-54.
- Youdim KA, Qaiser MZ, Begley DJ, Rice-Evans CA, Abbott NJ, 2004: Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radic Biol Med*, 36, 5, 592-604.
- Zhang L, Zhao H, Zhang X, Chen L, Zhao X, Bai X, Zhang J, 2013: Nobiletin protects against cerebral ischemia via activating the p-Akt, p-CREB, BDNF and Bcl-2 pathway and ameliorating BBB permeability in rat. *Brain Res Bull*, 96, 45-53.
- Zhang L, Zhang X, Zhang C, Bai X, Zhang J, Zhao X, Chen L, Wang L, Zhu C, Cui L, Chen R, Zhao T, Zhao Y, 2016: Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke *in vivo*. *Brain Res*, 1636, 130-141.

**\*Yazışma Adresi:** Filiz KAZAK  
Mustafa Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Biyokimya Anabilim Dalı, Hatay, Türkiye.  
e-mail: filizkazak@mku.edu.tr

## Viral Enfeksiyonlarda Telomeraz Aktivitesi

Elif BAYRAM<sup>1</sup>, Metin ÇENESİZ<sup>2</sup>, Semra OKUR GÜMÜŞOVA<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Viroloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

Geliş Tarihi: 06.01.2017

Kabul Tarihi: 15.02.2017

**Özet:** Lineer kromozomların uçlarında yer alan telomer adı verilen yapılar kromozomların bütünlüğünü sağlar. Kısa telomerler, DNA hasarında oluşan sinyale benzer bir sinyal üretirler, gerek yaşlanmayı gerekse de programlı hücre ölümünü tetikler. Telomeraz enzimi de kısalan telomerleri onararak telomer zincirlerinin uzun kalmasını sağlar. Böylece hücrelerin bölünme kapasitesinde artış sağlanmış olur. İnsan ve hayvan onkogenik viruslarının, geliştirdikleri mekanizmalarla telomeraz enzimini yeniden aktive edebildikleri ispatlanmıştır. Bu derleme viral enfeksiyonlar ile telomeraz aktivitesi arasındaki ilişkinin incelendiği bir dizi çalışmadan hazırlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Viral enfeksiyonlar, Telomer, Telomeraz.

### Telomerase Activity in Viral Infections

**Abstract:** The structures at the ends of linear chromosomes called telomeres provide the integrity of the chromosomes. Short telomeres produce a signal similar to DNA damage and triggering both programmed cell aging and programmed cell death. Also, telomerase enzyme restores shortened telomeres and allowing telomerase chains to stay longer. Thus increases the cleavage capacity of the cells. It has been proven that human and animal oncogenic viruses can re-activate telomerase enzyme in the cell through their new developed mechanisms. This review is prepared with series of studies that is examined the relationship between viral infections and telomerase activity.

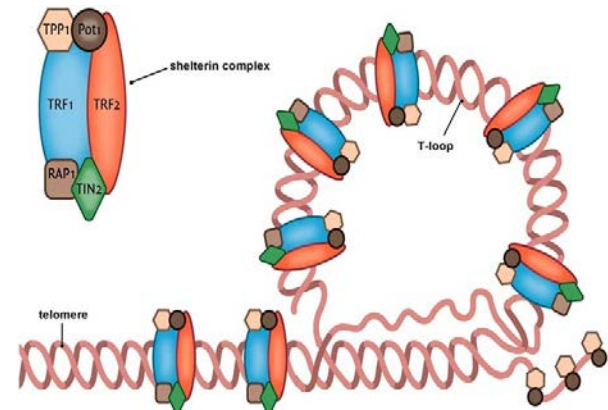
**Keywords:** Viral infections, Telomer, Telomerase.

### Giriş

Telomerler, kromozomların son kısmını rekombinasyon, yıkım ve füzyon gibi durumlara karşı koruyarak, kromozomların bütünlüğü ile stabilitesini sağlayan yapılar olarak tanımlanmaktadır (Riethman ve ark., 2001). Kromozomlar konusundaki ilk çalışmalarda terminal bölgede delesyon ve inversiyonların az sayıda olduğu bildirilmiş, ilerki çalışmalarda ise kromozomların bütünlüğünün telomerler tarafından sağlandığı belirlenmiştir (Blasco, 2005). Büyük looplar (ilme) halinde son bulan telomerlerin, T-loop yapısının, telomerin kendi üzerine kıvrılmasıyla, D-loop yapısının ise; guanince zengin tek ipliğin (G-kuyruğu) çift iplikli telomerin içine girip, telomer ipliklerinden birinin yerine geçmesiyle oluştuğu bilinmektedir (Neumann ve Reddel, 2002). Telomerin T-loop yapısına bağlı olarak bulunan, yapının stabilitesini sağlayan ve kromozomal uçların DNA hasarı olarak algılanmasını önleyerek, bu uçları koruyan 6 adet protein vardır. Bunlar TRF1 (Telomer Tekrar Faktör 1), TRF2 (Telomer Tekrar Faktör 2), POT1 (Telomer koruyucu 1), TIN2, TPP1 (tripeptidyl peptidaz 1) ve Rap1 (Represör Aktivatör Protein), "Sheltherin" kompleksini meydana getirmektedir (Şekil 1) (De Lange, 2005). TRF1, TRF2 ve TIN2 proteinleri, telomerazın tutunmasını bloke ederek telomerik kısalmaya neden olduklarından, telomerlerin negatif regülatörleri, POT1 ve TTP1 proteinleri ise

telomerlerin pozitif regülatörleri olarak kabul edilir (Smogorzewska ve De Lange, 2004).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda telomerlerde G-quadruplex (G- tetrad veya G4- DNA) yapılarının varlığı da tespit edilmiş ve G-4 DNA'yı stabilize eden ve telomeraz aktivitesini durdurabilen bileşiklerin kanser tedavisinde kullanılabileceği de ileri sürülmüştür. (Smith ve Johnson, 2010).



Şekil 1. Telomerde "sheltherin" kompleksi (De Lange, 2005).

**Telomer Uzunluğu ve Telomeraz:** Doku kültürü çalışmaları sırasında gözlemlenen telomer kısalmasının, somatik hücrelerde çoğalmayı sınırlayıp hücre yaşlanmasına, hatta ölüme yol açabilecek

değişikliklere neden olduğu bildirmiş ve laboratuvar araştırmaları sırasında hücrelerin bir kaç bölünmeden sonra çok fazla telomer nükleotiti kaybettiği için ölerak araştırmalarda sıkıntıya neden olduğu da ifade edilmiştir (Ramunas ve ark., 2015). Hücrelerde tespit edilen bu bölünme sınır sayısı "Hayflick Limiti" olarak adlandırılmaktadır (Eskiocak, 2007). Ayrıca, kısa telomerlerin DNA hasarına benzer bir sinyal üreterek, gerek yaşlanmayı gerekse de programlı hücre ölümünü tetiklediği, ölüm zamanına da biyolojik bir iç saat olan "Telomer Uzunluğunun" karar verdiği de ortaya konulmuştur (Jiang ve ark., 2013). Organizmada kısalan telomerleri onarmakla görevli telomeraz enzimi bulunur ve telomer zincirlerinin uzun kalmasını sağlar. Telomeraz (telomer deoksiniükleotidil transferaz, telomer terminal transferaz), ribonükleoprotein yapıda, kromozomal uçlardaki "TTAGGG" tekrarlarının sentezinden sorumlu özel bir DNA polimerazdır ve kromozomların sonundaki telomerlerden salgılanır. Telomeraz enziminin protein alt birimi olan *telomeraz revers transkriptaz (TERT)* ise telomerazın aktivitesini belirler. Telomeraz, bir hücrede ne kadar aktif ise, telomeri de o kadar uzun olur ve telomerlerin uzun olması hücrelerin bölünme kapasitesini artırır (Griffith ve ark., 1999).

**Telomeraz ve Viral Enfeksiyonlar:** Telomeraz aktivitesi ile insan ve hayvan tümör viruslarının ilişkisinin incelendiği çalışmalarda hücresel dönüşüm ve karsinogenezdeki telomeraz fonksiyonları belirlenmeye çalışılmıştır. Telomeraz aktivitesinde kodlanmayan viral RNA'ların (ncRNAs) ve konak hücre ncRNA'larda virus kaynaklı değişikliklerin destekleyici rol oynadığı bildirilmiştir (Hartwig ve ark., 2014). Bu çalışmalarda Epstein-Barr virusunun (EBV), Kaposi sarkomaya neden olan herpes virusun, insan papilloma virusunun (HPV), hepatit B virusunun (HBV), hepatit C virusunun (HCV) ve insan T-hücreli lösemi/lenfoma virüsü tip 1 (HTLV-1)'in telomeraz transkripsiyonunu arttırılabildiği görülmüştür (Bellon ve Nicot, 2008). Ayrıca, Hepatit B ve Hepatit C pozitif hastalarından alınan doku biyopsileri, normal karaciğer dokusu ile karşılaştırıldığında telomeraz aktivitesinin yüksek olduğu bildirilmiştir (Miura ve ark., 1997). Araştırmacılar, nazofarenks karsinomu olan hastalardan alınan örneklerin analizinde ise %97.5 EBV pozitifliği ve %94.9 oranında da telomeraz pozitifliği olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Kerekhanjanarong ve ark., 2000). EBV ile B-lenfoblastoid hücre hatlarının analizi sonrasında da telomeraz aktivitelerinin yüksek olduğu da bir başka çalışma ile gösterilmiştir (Bellon ve Nicot, 2008). Araştırmacılar, insan kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirus 8 (KSHV/ HHV-8) ile enfekte olan endotel hücrelerini enfekte olmamış hücreler ile karşılaştırdıklarında ise yüksek

telomeraz aktivitesine sahip olduklarını bildirmişlerdir (Flore ve ark., 1998).

Hayvan viruslarından Marek hastalığı virusu (MDV) ile tavuklarda yapılan çalışmalarda ise virusun çok az miktarda telomeraz ribonükleoprotein kompleksi, revers transkriptaz aktivitesi (TERT) ve bir RNA alt birimi (TR) ile bir protein alt birimi içerdiğini gösterilmiştir (Shkreli ve ark., 2007). Ayrıca, MDV enfeksiyonu sırasında viral RNA alt birimlerinin (vTR) telomeraz aktivitesini arttırarak T-hücresi ölümsüzleşmesine neden olduğu, yani diğer bütün onkojen virusler gibi MDV'nin de telomeraz aktivitesini arttırdığı görülmüştür (Fragnet ve ark., 2003). Bovine Leukemia Virus (BLV) ile enfekte hayvanlarda da telomeraz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Szczotka ve Kuzmak, 2013). Ayrıca bir başka çalışmada BLV enfeksiyonunun persiste lenfositosis aşamasında yada gözle görülebilir tümörlerin tespiti sırasında telomeraz aktivitesinin yükseldiği ve bu yükselişin istatistiksel olarak anlamlı bulunduğu da bildirilmiştir (Hemmatzadeh ve ark., 2015). Ayrıca bazı tümör viruslarının telomeraz ve telomer uzunluğunun düzenlenmesinde etkili olduğu hatta bazı virusların virus ve konakçısı arasındaki karmaşık ilişkiyi düzenlerken telomerazın negatif olması için ek bir mekanizma geliştirdikleri ve bir çok tümör virus proteininin, hücrenin telomeraz ekspresyonunu arttırmak için transkripsiyon faktörleri gibi hareket ettiğini de belirlenmiştir (Bellon ve Nicot, 2008). Örneğin, HBV'un transaktivatör onkoproteininin (HBV X) karaciğer hücrelerindeki telomeraz ekspresyonunu ve telomeraz aktivitesi arttırdığı gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2005). EBV ile kodlanan latent membran proteini-1'in (LMP1) ise, temel hücre içi sinyal yollarından olan nükleer faktör kappa B (NF-κB) ve JAK/STAT sinyal yollarını kullanarak apoptozisi önleyip karsinogenez tümör aktivasyonuna neden olduğu ortaya konmuştur (Zheng ve ark., 2007). Ayrıca, araştırmalarla, EBV enfeksiyonu sırasında saptanan artmış telomeraz aktivitesinin, epitel hücrelerinin EBV ile enfeksiyonuna katkı sağladığı da belirlenmiştir (Rac ve ark., 2015). EBV ile enfekte nazofarengeal epitel hücrelerinde ve B-hücresi lenfomalarında ise LMP1'in telomeraz aktivitesi artışından sorumlu olduğu ve LMP1'in ekspresyonunun EBV-negatif bir nazofarengeal karsinom hücrelerinin hTERT protein ekspresyonunu da arttırdığı bildirilmiştir (Mei ve ark., 2006). EBV latent membran proteini 2A'nın (LMP2A) negatif düzenleyici bir hTERT promotörü gibi hareket edebildiğini de tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2005). Bir başka çalışmada ise, EBV' a bağlı tümör gelişiminde, TERT ekspresyonu ve telomeraz aktivasyonunun kritik rol oynadığı bildirilmiştir. (Dolcetti ve ark., 2014).

Kuşlarda da tıpkı insanlarda olduğu gibi embriyonik dönemde ve gelişmekte olan organlarda telomeraz aktivitesi mevcut iken somatik dokularında ise yok denecek kadar azdır (Delany ve Daniels, 2003). Hayvan viruslarından MDV' nin bilinen ilk fonksiyonel telomeraz RNA alt birimini kodlayan virus olduğu da ifade edilmiştir (Shkreli ve ark., 2007). Ayrıca, yapılan çalışmalarda Avin Leukosis Virus'un (ALV) viral LTR'sinin (uzun terminal tekrarları) özellikle ters yönde, telomeraz promotör aktivitesini arttırdığı TERT transkripsiyon üzerinde dolayısıyla da telomeraz aktivitesinde doğrudan düzenleyici etkisi olduğu sonucuna varılmıştır (Feng ve ark., 2007).

Bu veriler ışığında telomeraz ve hücre yaşlanması üzerinde çalışan araştırmacılar ise, Simian Virus 40 (SV 40), insan papillomavirus (HPV) ve adenovirus gibi DNA tümör virusları ile transformasyon sonrası hücre yaşlanmasının önüne geçilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca tümör viruslarında, hücredeki p53 ve p110RB gibi hücrenel tümör baskılayıcı proteinlere bağlanarak onları inaktive edebilen proteinler olduğunu da ortaya konmuştur. Hücrenel tümör baskılayıcı proteinlerde meydana gelen bu inaktivasyon, viruslar tarafından transforme edilen hücrelerin uzun hayat döngüsünü de açıklamaktadır. Hatta mutasyonlar ve gen delesyonları nedeniyle, pek çok ölümsüz hücrede p53 ve p110RB proteinlerinin bulunmadığı da saptanmıştır (Bryan ve Reddel, 1997).

## Sonuç

Sonuç olarak, insanlarda ve hayvanlarda telomer uzunluğunun ve telomeraz aktivitesinin kanser, yaşlanma ve ölüm ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Kısa telomerlerin DNA hasarına benzer bir sinyal üreterek, gerek yaşlanmayı gerekse de programlı hücre ölümünü (apoptozis) tetiklediği, ölüm zamanına da biyolojik bir iç saat olan "Telomer Uzunluğunun" karar verdiği de bu konudaki önemli verilerdendir. Ayrıca insanların ve hayvanların somatik hücrelerinde yok denecek kadar az olan veya hiç varlık göstermeyen telomeraz aktivitesine karşın onkojenik viruslarla enfekte olmuş hücrelerde telomeraz aktivitesinin yeniden başladığı ve bunun hücre yaşlanmasının önüne geçilebileceği iddia edilmektedir. Ancak, onkojen hayvan virusları ile ilgili bu konudaki çalışmalar sınırlıdır. Genellikle insanlar için patojen olmayan bu viral etkenlerin, telomeraz aktivitesi üzerine etkileri ve bu etkenlerin hücre yaşlanması ve kanserin ortadan kaldırılması konusundaki etkilerinin daha ayrıntılı olarak araştırılması önerilmektedir.

## Kaynaklar

- Bellon M, Nicot C, 2008: Regulation of Telomerase and Telomeres: Human Tumor Viruses Take Control. *J Natl Cancer Inst*, 100, 98-108.
- Blasco MA, 2005: Telomeres and Human Disease: Aging, Cancer and Beyond. *Nature Reviews: Genetics*, 6, 611-22.
- Bryan TM, Reddel RR, 1997: Telomere Dynamics and Telomerase Activity in In vivo Immortalised Human Cells. *Europ J Canc*, 33, 5, 767-73.
- Chen F, Liu C, Lindvall C, Xu D, Ernberg I, 2005: Epstein-Barr virusu, latent membran 2A (LMP2A) telomeraz epitel hücre hatlarında transkriptazı (hTERT) ters aşağı regüle. *Int J Cancer*, 113, 284-289.
- De Lange T, 2005: Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*, 19, 2100-2110.
- Dolcetti R, Giunco S, Col DJ, Celegghin A, Mastorci K, De Rossi A, 2014: Epstein-Barr virus and telomerase: from cell immortalization to therapy. *Infectious Agents and Cancer*, 9, 8.
- Eskioçak U, 2007: Investigation of telomerase activity in diagnosis of endometrial and cervical cancer. Yüksek Lisans tezi, ODTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Feng Y, Xian RR, Li Y, Polony TS, Beemon KL, 2007: Telomerase reverse transcriptase expression elevated by avian leukosis virus integration in B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci*, 104, 18952-18957.
- Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM, Cesarman E, 1998: Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nature*, 394, 588-592.
- Fragnet L, Blasco MA, Klapper W, Rasschaert D, 2003: The RNA subunit of telomerase is encoded by Marek's disease virus. *J Virol*, 77, 5985-5996.
- Griffith DJ, Corneau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Mossus H, De Lange T, 1999: Mammalian telomeres an in a large duplex loop. *Cell*, 97, 503-514.
- Hartwig FP, Goedert L, Wagner MS, Schultze E, 2014: Tumor Cell Development: A Role for Viruses and Telomerase Activity? *Advances in Tumor Virology*, 4, 7-16.
- Hemmatzadeh F, Keyvanfar H, Hasan NH, Niap F, Bani Hassan E, Hemmatzade A, Ebrahimie E, McWhorter A, Ignjatovic J, 2015: Interaction between Bovine leukemia virus (BLV) infection and age on telomerase misregulation. *Vet Res Commun*, 39, 2, 97-103.
- Jiang J, Miracco EJ, Hong K, Eckert B, Chan H, Cash DD, Min B, Zhou ZH, Collins K, Feigon J, 2013: The architecture of Tetrahymena telomerase holoenzyme. *Nature*, 496.
- Kerekhanjanarong V, Sitawarin S, Sakdikul S, Saengpanich S, Chindavijak S, Supiyaphun P., Voravud N, Mutirangura A, 2000: Telomerase assay and nested polymerase chain reaction from nasopharyngeal swabs for early noninvasive detection of nasopharyngeal carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 123, 624-629.

- Mei YP, Zhu XF, Zhou JM, Huang H, Deng R, Zeng YX, 2006: siRNA targeting LMP1-induced apoptosis in EBV-positive lymphoma cells is associated with inhibition of telomerase activity and expression. *Cancer Lett*, 232, 189-198.
- Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, Ohmura H, Ito H, Hirohashi S, Shay JW, Oshimura M, 1997: Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*, 93, 56-62.
- Neumann AA, Reddel RR, 2002: Telomere maintenance and cancer? look, no telomerase. *Nature Reviews Cancer*, 2, 879-884.
- Rac J, Haas F, Schumacher A, Middeldorp JM, Delecluse HJ, Speck RF, Bernasconi M, Nadal D, 2015: Telomerase Activity Impacts on Epstein-Barr Virus Infection of AGS Cells. *Plos One*, 10, 4, 1-24.
- Ramunas JE, Yakubov JJ, Brady SY, Corbel C, Holbrook M, Brandt J, Stein JG, Santiago JP, Cooke HMB, 2015: Transient delivery of modified mRNA encoding TERT rapidly extends telomeres in human cells. *The FASEB Journal*, 29, 5, 1930-1939.
- Riethman HC, Xiang Z, Paul S, Morse E, Hu XL, Flint J, Chi HC, Grady DL, Moyzis RK, 2001: Integration of Telomere Sequences with the Draft Human Genome Sequence. *Science*, 409, 948-950.
- Shkreli M, Dambrine G, Soubieux D, Kut N, Rasschaert D, 2007: Involvement of the Oncoprotein c-Myc in Viral Telomerase RNA Gene Regulation during Marek's Disease Virus-Induced Lymphomagenesis. *J Virol*, 81, 9, 4848-4857.
- Smith JS, Johnson FB, 2010: Isolation of G-Quadruplex DNA Using NMM-Sepharose Affinity Chromatography. *Methods Mol Biol*, 608, 207-21.
- Smogorzewska A, De Lange T, 2004: Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem*, 73, 177-208.
- Szczotka M, Kuzmak J, 2013 Telomerase activity and telomere length in cattle infected with bovine leukemia virus (Blv). *J Comp Pathol*, 148, 70.
- Zhang X, Dong N, Zhang H, You J, Wang H, Ye L, 2005: Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. *J Lab Clin Med*, 145, 98-104.
- Zheng H, Li LL, Hu DS, Deng XY, Cao Y, 2007: Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cell Mol Immunol*, 4, 185-196.

**\*Yazışma Adresi:** Semra OKUR GÜMÜŞOVA  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Viroloji Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye  
e-mail: semragumusova@hotmail.com

## In Vitro Sitotoksosite Testleri

Orhan TOKUR\*, Abdurrahman AKSOY

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.

Geliş Tarihi: 08.02.2017

Kabul Tarihi: 03.04.2017

**Özet:** Kimyasal ve biyolojik maddeler ya da fiziksel etkenler, hücreleri değişik derecelerde etkileyerek sitotoksositeye yol açabilirler. Bir maddenin biyolojik davranışının anlaşılabilmesi için hücreler üzerindeki toksik ya da non-toksik etkisinin belirlenmesi gereklidir. İn vitro sitotoksosite testleri, ilaç niteliği taşıyan veya toksik profili araştırılan maddelerin değerlendirilmesi amacıyla hücre kültüründe gerçekleştirilen ölçüm metodlarıdır. Bu testlerle çok sayıda maddenin kısa sürede analiz edilmesi mümkün olmakta ve yapılacak hayvan denemeleri için temel veriler elde edilebilmektedir. Farklı mekanizmalara ve hassasiyetlere sahip çok sayıda sitotoksosite testi bulunmakla birlikte bu derlemede, araştırmacılar tarafından sıkça tercih edilen tetrazolyum testleri (MTT, MTS, XTT, WST), LDH testi, alamalar mavisi testi ve biyoluminesans testleri ele alınmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *In vitro*, Sitotoksosite, Hücre canlılık testleri.

### In Vitro Cytotoxicity Assays

**Abstract:** Chemical, biological and physical factors may cause cytotoxicity by affecting cells at different degrees. To understand the biological characteristic of a compound, it is essential to determine its toxic or non-toxic effects. In vitro cytotoxicity assays (cell viability assays) are cell culture based measuring methods that usually used for either evaluating possible drug candidates or investigating cytotoxic profiles of some compounds. It is possible to assess many compounds in a short period of time and obtain fundamental information necessary for further animal experiments through this methods. There are many cell viability assay methods exist based on colorimetric, enzymatic, luminometric principals etc that have different mechanisms and varied sensitivity. The popular assays, such as MTT, MTS, XTT, WST, LDH enzyme assay, alamar blue assay, ATP bioluminescent assay have summarized in this review.

**Keywords:** *In vitro*, Cytotoxicity, Cell viability assays.

### GİRİŞ

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel olarak tasarlanmış kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan arı bir şekilde yaşatılmasıdır. İnsan da dâhil olmak üzere herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi, hücre kültürü çalışmalarının tercih sebepleri arasında yer almaktadır (Zucco ve ark., 1998). Hücre kültürünün sıkça tercih edildiği alanlar kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksosite çalışmalarıdır (Gilbert ve Boutros, 2016). Sitotoksik terimi, hücre ölümüne neden olan anlamına gelmektedir. Sitotoksosite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse in vivo çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir (Riss ve Moravec, 2004). Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağlı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa

apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler (Galluzzi ve ark, 2009). Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir (Riss ve ark., 2006). Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır (Niles ve ark., 2007). Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksosite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir (Riss ve ark., 2006). Sitotoksosite belirleme metodları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Crouch ve ark., 1993; Fan ve Wood, 2007; Longo-Sorbello ve ark., 2006).

Kolorimetrik metodlarda, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT), 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS), 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid (XTT), 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST) gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyolet, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri

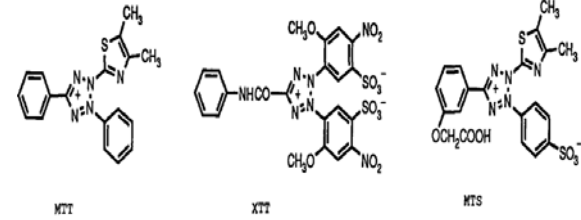
kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır (Borenfreund ve Puerner, 1985; Feoktistov ve ark., 2016; O'Connor ve ark., 1998; Riss ve ark., 2006). Luminometrik metodlar, floresans ve biyoluminesans olarak ikiye ayrılmaktadır. Floresans metodlarda, floresans özellikteki maddeler kullanılırken, biyoluminesans metodlarda lusiferaz denilen özel enzimler ve bunların substratlarının kullanımı ile canlı/ölü hücre tespiti yapılması söz konusudur. Daha gelişmiş biyoluminesans metodlarda (gerçek zamanlı biyoluminesans), hücrelerin sitotoksik madde ile maruziyeti, sadece testin yapıldığı anda değil, maruziyet süresince incelenebilir hale gelmiştir (Duellman ve ark., 2015). Hücre hasarını ya da ölümünü takiben vasata sızan enzimler de ölü hücre sayısının belirteci olarak ele alınmıştır. Bu enzimler içerisinde stabilitesi ile öne çıkan laktat dehidrojenaz (LDH), hücre ölümü belirteci olarak canlılık testleri arasındaki yerini almıştır (Korzeniewski ve Callewaert, 1983).

Hücre sayısı tespitinde kullanılan metodlar içerisinde, mikroskopi (tripan mavisi ile boyama-thoma lamı) ya da elektronik sayıcı ile otomatik sayım gibi, özellikle rutin hücre kültürü işlemlerinde kullanılan metodlar da bulunmaktadır. Ancak bu metodlar çok zaman alması nedeniyle, çok sayıda numune kullanılan (mikropleyt formatı) çalışmalar için uygun değildir (Connolly ve ark., 1986). Çok sayıda maddeyi kısa sürede pratik olarak değerlendirebilmek, mikropleytlar ve bunlara uyarlanan testlerin geliştirilmesiyle mümkün olmuştur ve "ekle-karıştır-ölç" prensibiyle hem zamandan kazanılmış hem de uygulama kolaylığı sağlanmıştır (Riss ve Moravec, 2006; Weyermann ve ark., 2005).

#### Tetrazolyum Tuzları İle Yapılan Testler:

Tetrazolyum tuzları, heterosiklik organik yapıda bileşiklerdir. Keşfedildiği yıllardan günümüze kadar 1000'i aşkın üyesi sentezlenmiş ve tanımlanmıştır (Altman, 1976). Tetrazolyum tuzlarının elektron alarak indirgenmeleri, formazan denilen yapıya dönüşmelerini sağlayarak, renk değişikliğini beraberinde getirir. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir ve böylece renk reaksiyonunu yalnızca canlı hücreler meydana getirebilirler (Mossman, 1983). Ölü hücreler ise tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybeder ve herhangi bir renk değişimine neden olmazlar (Riss ve Moravec, 2006). Bu değişimin, in vitro ortamda yalnızca canlı hücreler tarafından yapılabilmesi, tetrazolyum bileşiklerini biyolojik anlamda oldukça önemli kılmıştır (Altman, 1976). Mossman (1983) tarafından geliştirilen MTT testinden sonra, XTT, MTS, WST-1, WST-8 gibi farklı özelliklere sahip tetrazolyum bileşikleri geliştirilerek

kolorimetrik metodlara eklenmişlerdir (Barltrop ve ark., 1991; Ishiyama ve ark., 1995; Mossman, 1983; Paull ve ark., 1988; Scudiero ve ark., 1988; Tominaga ve ark., 1999). Sıkça kullanılan bazı tetrazolyum bileşiklerinin kimyasal yapıları Şekil 1'de gösterilmiştir.



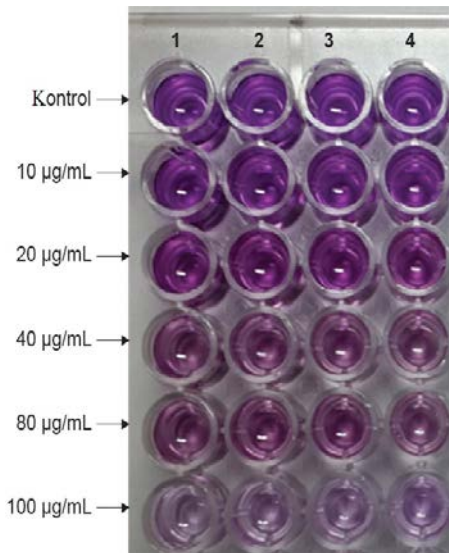
Şekil 1. MTT, XTT ve MTS bileşiklerinin kimyasal yapıları (Barltrop ve ark., 1991'den).

Araştırmalarda, çok sayıda tetrazolyum-formazan maddesi kullanılmış olmakla beraber bunlardan sadece birkaç tanesi kabul görmüş ve biyolojik sistemlere uyumluluğu sağlanmıştır (Altman, 1976; Barltrop ve ark., 1991). Bu bileşikler, hücre içine girebilme ve vasatta çözünme özelliklerine göre ikiye ayrılırlar. İlk grupta bulunan MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir ancak indirgenme sonucu oluşan formazan, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla vasatta kristal şeklinde çökelmektedir. İkinci grupta bulunan MTS, XTT ve WST bileşikler ise negatif yüklü olup hücre membranını geçemezler. Bu yüzden ilgili bileşiklerle birlikte ara elektron alıcı moleküllerin (fenazin metil sülfat, fenazin etil sülfat) kullanılması zorunluluğu doğar. Elektron alıcı molekül, hücre içerisine girerek sitoplazmadan ya da plazma membranından elektron alır ve vasata geri dönerek tetrazolyum bileşiğini indirger. İkinci gruptaki bileşiklerin indirgenmesi sonucu oluşan formazan ise suda ve dolayısıyla vasatta çözünür niteliktedir (Riss ve ark., 2016). Tetrazolyum bileşikleriyle yapılan canlılık testleri, üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada hücreler belirli bir süre toksik maddeye maruz bırakılırlar. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği vasata eklenir ve ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu esnada canlı hücreler ilgili bileşikler indirgeyip formazana dönüştürerek renk değişimini gerçekleştirir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (Mossman, 1983; Riss ve Moravec, 2004). MTT test belirteci eklendikten oluşan renk değişimi Şekil 2'de gösterilmiştir.

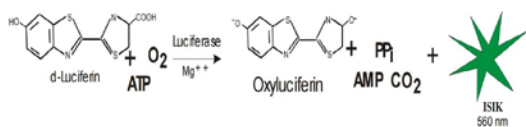
Ölçüm sonucu oluşan sinyal miktarı, tetrazolyum tuzu konsantrasyonu, hücre tipi, canlı hücre sayısı ve metabolik kapasitesi, vasat içeriği, vasat pH'ı, pleyt-flask ya da kuyucuk yapısı gibi



parametrelerle doğrudan ilişkilidir (Denizot ve Lang, 1986; Riss ve ark., 2016). MTT bileşiği sarı renklidir, oluşan formazan ise mor renkli olup suda çözünmez niteliktedir ve absorbansın ölçülebilmesi için uygun bir çözücüde çözdürülmelidir. Denizot ve Lang (1986) tarafından, MTT testinde oluşan formazanı çözdürmek için dimetil sülfoksit (DMSO) kullanımının uygun olduğu ortaya konulmuştur. Çözücü olarak genellikle tercih edilen DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik etkisi bilinmektedir ve bu da test güvenilirliğini azaltmaktadır (Paull ve ark., 1988). Ayrıca çözdürmek için yapılan pipetleme esnasında formazan kristallerinin zarar görmesi de test hassasiyetini düşüren diğer bir etkidir (Martin ve Clynes, 1993). XTT, MTS ve WST testlerinde, ek bir çözdürme işlemine gerek duyulmamasının yanında, deney süresince çeşitli zamanlarda absorbansın kaydedilmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede canlılığın değerlendirilmesi hakkında daha detaylı ve hücre sayısı hakkında MTT testine nazaran daha hassas bilgi sunarlar. Bu gruptaki tetrazolyum tuzları, kimyasal özellikleri dolayısıyla kendileriyle beraber elektron bağlayıcı ajanların (electron coupling agent, PES) kullanımını gerektirmektedirler (Barltrop ve ark., 1991; Riss ve Moravec, 2006).



Şekil 2. MTT testinde oluşan renk değişimi (Aravinthan ve ark., 2015).



Şekil 3. ATP biyoluminesans reaksiyonu (Held P, 2004'ten uyarlanmıştır).

**LDH Enzim Salverilmesi Testi:** Hücre canlılığının değerlendirilmesinde kullanılan diğer bir metot ise hasarlı/ölü hücrelerden vasata salınan laktat dehidrojenaz (LDH) aktivitesinin belirlenmesidir (Decker ve Lohmann-Matthes, 1988; Korzeniewski ve Callewaert, 1983). Laktat dehidrojenaz, tüm hücrelerde bulunan sitoplazmik bir enzimdir. Hücreler, toksik etkilere maruz kaldığında plazma membran bütünlükleri bozulur ve LDH enzimi hücrelerden sızarak vasata geçer. Böylece maruziyet sonrası LDH enzim aktivitesi ölçülerek hücre hasarı değerlendirilebilir (Lappalainen ve ark., 1994; Riss ve Moravec, 2006).

LDH aktivitesinin belirlenmesi için uygulanabilecek iki farklı metot bulunmaktadır. İlk metotta kullanılan test belirteci, hücrelere toksik olması dolayısıyla LDH salınımına neden olup test değerlerini bozabilmektedir. Bu nedenle hücrelerin toksik madde ile maruziyeti sonrası, kuyucuklardan alınan bir miktar vasat başka bir mikropleyete aktarılır ve test belirteci eklenerek birkaç saat inkübe edilir (Riss ve Moravec, 2006). İnkübasyon sırasında vasatta bulunan LDH, pirüvatin laktata dönüşümünü katalize eder. Bu enzimatik aktivite esnasında, NADH oksidasyona uğrayarak NAD<sup>+</sup>'a dönüşür. İncelenen vasattaki NADH miktarı, 340 nm absorbansta, mikropleyit okuyucu ile belirlenerek test tamamlanır (Decker ve Lohmann-Matthes, 1988; Lappalainen ve ark., 1994; Riss ve Moravec, 2002). İkinci yöntemde resazurin boyası ve diaforaz enzimi kullanılmaktadır. Test belirteci, direkt hücreler üzerine eklenir. On dakikalık inkübasyon süresi yeterlidir. Bu metot, diaforaz enziminin katalize ettiği bir reaksiyonla, vasatta bulunan NADH'in, resazurin boyasını floresans bir madde olan resorufin'e indirgemesi ve sonrasında floresans sinyalinin florometre ile ölçümü prensibine dayanmaktadır. (Riss ve Moravec, 2006). LDH testi ile ölçülen enzimatik aktivitenin zamana bağlı olarak doğal yıkımlanmaya uğrayabilmesi, pH ve vasat kompozisyonundan etkilenebilmesi, hassasiyetini düşüren dezavantajlarından bazılarıdır (Galluzzi ve ark., 2009). Hücreler hasar aldıktan ya da öldükten sonra vasata geçen LDH'nın yarı ömrü ortalama 9-10 saat kadardır. Toksik madde ile uzun süreli maruziyet gerektiren çalışmalarda, LDH'nın yarı ömrü ve çoğalan hücrelerin LDH oranını değiştirmesi gibi faktörler, hassasiyeti düşürmektedir. Örneğin; 48 saatlik maruziyet periyodu belirlenen bir çalışmada, 48 saatlik sürenin başında ölen hücrelerden vasata salınan LDH aktivitesi en geç 12 saat içerisinde sonlanacak ve deney sonunda tespit edilemez hale gelecektir. Sayılan bu nedenlerden ötürü LDH testi uzun süreli maruziyet çalışmalarına uygun değildir (Riss ve ark., 2006). Farklı hücre hatlarından köken alan ve vasata salınan LDH'nın stabilitesi farklılık göstermektedir. Özellikle

fibroblastların endojen LDH seviyeleri düşük olduğu için bu hücre hattıyla LDH testinin kullanımı uygun değildir (Zucco ve ark., 1998).

#### Lüminesans Metodlar:

**a) Alamar Mavisi Floresans Testi ve Diğer Floresans Metodlar:** Alamar mavisi testi, Erb ve Ehlers (1950) tarafından, biyolojik sıvılarda ve sütte bakteriyel kontaminasyonun belirlenmesi amacıyla ilk kez 1950'lerde kullanılmış, daha sonra Ahmed ve ark. (1994), bu testi radyoaktif [<sup>3</sup>H]timidin birleşme testine alternatif olarak hücre kültürüne uyarlamıştır. Bu metod, alamar mavisi (resazurin) adlı bileşiğin, canlı hücreler tarafından resorufin bileşiğine dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır. Resazurin, oksidatif formda bulunan koyu mavi renkte bir redoks boyasıdır, hücre zarından serbestçe geçerek hücrelere girer ve burada indirgenerek floresans özellikteki pembe renkli resorufin bileşiğine dönüşür. Ölü hücreler, metabolik aktivitelerini kaybettikleri için resazurini indirgeyemez ve floresans sinyali oluşturamazlar. Oluşan sinyal, florometre kullanılarak tespit edilir ve canlı hücre sayısı arttıkça sinyal şiddetlenir (Ahmed ve ark., 1994; O'brien ve ark., 2000; Riss ve Moravec, 2006; Silva ve ark., 2016).

Resazurin, PBS içerisinde çözünebilmektedir. Hücrelerin toksik madde ile maruziyeti sonrası, resazurin taşıyan test belirteci, direkt olarak vasata eklenerek uygun bir inkübasyon periyodu sonrasında ölçüm yapılarak test tamamlanır. Metabolik aktivitesi düşük hücre hatları ile yapılan çalışmalarda, yeterli sinyal oluşumunun sağlanması için inkübasyon süresinin artırılması oldukça önemlidir (Riss ve Moravec, 2006; Silva ve ark., 2016). Alamar mavisi testinde, lizis, ekstraksiyon ve yıkama gibi zaman ve emek gerektiren prosedürler bulunmamaktadır. pH değişikliklerine karşı dayanıklılığı gösterilen alamar mavisi testi, fetal dana serumu ve fenol kırmızısı içeren vasatlarda kullanıldığında, bu maddelerin ölçüm esnasında herhangi bir sinyal gürültüsüne yol açmadığı gösterilmiştir (Ahmed ve ark., 1994; Silva ve ark., 2016).

Alamar mavisi testinde, renk değişikliği oluştuktan sonra, hücreler vasattan çıkarılsa ya da sonradan ölse dahi renk değişikliği sabit kalır ve bu da kullanımını sınırlayan nedenlerden biridir. Hücrelerin üreme ve gelişmeleri sırasında ortama verdikleri metabolitler ve vasat kompozisyonundan oldukça etkilenen alamar mavisi, hücreler öldükten sonra metabolitleri halen vasatta bulunduğu için tekrar eski okside formuna dönememez ve bu da testin belirleyiciliğini negatif etkiler (Ahmed ve ark., 1994; Squatrito ve ark., 1995). Alamar mavisi dışında, hücre canlılığını belirlemede kullanılan proteaz ve esteraz enzim aktivitesine dayalı iki farklı floresans

metodu bulunmaktadır. Bu metodlar, canlı ve ölü hücrelerin, proteaz ve esteraz aktivitesi yönünden ayrılması prensibine dayanmaktadır (Niles ve ark., 2007, Sali ve ark., 2016). Proteaz aktivitesine dayalı metotta, hücre zarını geçebilen florojenik proteaz substratı (glisilfenilalanil-aminoflorokumarin; GF - AFC), canlı hücreler içerisine girer, sitoplazmik aminopeptidazlar tarafından glisin ve fenil amino asitlerinin uzaklaştırılmasıyla floresans sinyali yayan aminoflorokumarine (AFC) dönüştürülür ve böylece canlı hücre sayısı hakkında bilgi verir. Ayrıca GF-AFC substratına benzer şekilde, yine proteaz substratı bir peptid olan ancak hücre içine girme yeteneği olmayan rodamin (aminolusiferin), hücre ölümünü takiben vasata geçen proteazlar tarafından florojenik formuna dönüştürülür ve böylece ölü hücre sayısı hakkında bilgi verir. Metod, iki farklı substrattan birinin uygulanması şeklinde yapılabilsede bu iki belirtecin kombine halde uygulanması, proteaz testinin hassasiyetini önemli ölçüde artırmaktadır (Niles ve ark., 2007). Esteraz aktivitesinin ölçümüne dayalı metotta ise ester formunda substrat halinde bulunan kalsein-asetoksi-metilester (CAM) isimli madde, sadece canlı hücrelerin ester bağlarını kırabileceği prensibine dayanarak hücre canlılığını belirlemektedir. Canlı hücreler tarafından ester bağının yıkılmasıyla oluşan serbest kalsein, hücre içerisinde kalarak floresans gösterir ve oluşan sinyalin ölçümü florometre ile yapılır (Sali ve ark., 2016).

**b) ATP Biyölüminesans Testi:** Adenozin trifosfat (ATP) molekülü, biyolojik sistemlerde enerji kaynağı olarak görev yapar ve metabolik olarak aktif tüm hücrelerde bulunur (Crouch ve ark., 1993). Hücre ölümünü takiben, hücrenin ATP sentez yeteneği kaybolur ve endojen ATPazlar mevcut ATP'yi hızlı bir şekilde yıkımlarlar. Bu nedenle intrasellüler ATP içeriği, hücre canlılığının temel göstergesi olarak nitelenmiş ve canlılık belirleme metodları arasındaki yerini almıştır. ATP biyölüminesans testi, multipleytlerde yapılan canlılık testleri arasında en hızlı, en hassas ve en kolay metod olarak tanımlanmaktadır (Lomakina ve ark., 2015; Riss ve ark., 2006).

ATP konstrasyonunun ölçülebileceği, enzimsel-spektrofotometrik, radyografik, biyölüminesans gibi farklı metodlar mevcuttur. Biyölüminesans metodu, bunların içerisinde en hassas metod olması dolayısıyla ön plana çıkmıştır (Lomakina ve ark., 2015). Lüminesans özellik gösteren çok sayıda biyolojik madde bulunmakla beraber bu zamana kadar bunlardan sadece üç tanesi, Firefly (ateşböceği-*Photuris Pennsylvanica*), Renilla ve Aequorin isimli canlılardan elde edilen substratlar, biyölüminesans testlerine uyum sağlayabilmiş ve kullanıma girmiştir. ATP biyölüminesans testi,

normalde ateş böceklerinde meydana gelen biyoluminesans reaksiyonunun takliti prensibine dayanır. Lusiferaz ve bu enzimin substratı olan lusiferin, test belirteci olarak kullanılarak, hücrelerde bulunan ATP aracılığıyla lüminesans oluşumu sağlanır (Fan ve Wood, 2007; Riss ve Moravec, 2006). Lusiferaz enzimi, 61 kDa ağırlığında monomerik bir enzimdir. Bu enzim, öncelikle lusiferin ile ATP'yi birbirine bağlayarak lusiferil-AMP ara ürününü meydana getirir. Bu ürün ise magnezyum iyonları varlığında, oksijen ile reaksiyona girerek oksitlenir ve eksite enerji düzeyindeki bir bileşik olan oksilusiferine dönüşür. Oksilusiferin, kararlı enerji düzeyine dönerken fazla enerjisini foton olarak yayar ve sarı-yeşil renkte ışık oluşturarak 560 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon verir (Fan ve Wood, 2007; Lomakina ve ark., 2015).

ATP biyoluminesans testinde kullanılan test belirteci içerisinde, canlı hücreleri lize edip ATP içeriğini açığa çıkarmak için deterjan, asit vb maddeler, çıkarılan ATP'nin yıkılmasını önlemek için ATPaz inhibitörleri, lusiferaz, lusiferin, buffer ve stabil bir lüminesans sinyali oluşturmak için gerekli şartları sağlayan diğer maddeler bulunmaktadır. Lusiferaz enzimi, hücre içine penetre olamadığı için canlı hücrelerde bulunan ATP miktarını ölçemekte ve bu nedenle hücrelerin lize edilmesi gerekmektedir. Hücreleri lize etmek için deterjan maddeler ve karışımları, güçlü asitler (perklorik asit, triklorasetik asit), organik solventler (butanol, kloroform, dimetil sülfoksit) gibi farklı maddeler kullanılmaktadır (Lomakina ve ark., 2015). Sali ve ark. (2016), perklorik asit ile yapılan lizis işlemini altın standart olarak tanımlamıştır. Test, toksik madde ile maruziyeti takiben hücrelerin lize edilmesi, açığa çıkan ATP'nin, lusiferin-lusiferaz ile reaksiyona girmesi ve oluşan lüminesans sinyalinin luminometre ile ölçülmesi sırasıyla gerçekleştirilmektedir (Crouch ve ark., 1993; Lomakina ve ark., 2015; Riss ve ark., 2006). Lüminesans sinyali, alternatif olarak bazı florometre modelleri ile de ölçülebilir ancak bunlar luminometre kadar hassas değildir (Riss ve ark., 2006). ATP testinin uygulama kolaylığı, hızlı sonuç vermesi ve canlılık testleri arasındaki en hassas test olması, öne çıkan özellikleri arasındadır (Petty ve ark., 1995; Riss ve Moravec, 2006; Weyermann ve ark., 2005). ATP testi, yüksek düzeydeki hassasiyeti nedeniyle, çok daha fazla sayıda maddenin eş zamanlı olarak incelenmesine imkan veren 1536'lık mikropleyt formatına uygundur (Riss ve ark., 2016). Test için gerekli luminometre cihazı, her laboratuvarında bulunmamakta ve bu testin maliyeti, en önemli dezavantajı olarak ortaya çıkmaktadır (Riss ve Moravec, 2006).

**c) Gerçek Zamanlı (Real Time) Biyoluminesans Testi:** Canlılık testlerinin büyük çoğunluğu, hücreleri yok eden veya daha ileri incelemelere izin vermeyen son test (end-point) formatındadır ve bu da toksik maddenin kinetiğini ve gerçek zamanlı analizini imkânsız hale getirmektedir. Toksikite, zaman ve doza bağlı olduğu için, farklı doz aralıklarının etkileri ancak farklı zamanlarda incelenerek anlaşılabilir. ATP biyoluminesans testine benzer şekilde bu testte de lusiferaz enzimi kullanılmaktadır. Ancak bu testte kullanılan lusiferaz enzimi, farklı bir canlıdan elde edilir. Lusiferaz prosubstratı olarak ise koelenterazin denilen bir madde kullanılmaktadır (Duellman ve ark., 2015).

Renilla lusiferazı, Sea Pansy (*Renilla reniformis*) isimli bir çeşit deniz canlısından elde edilen 36 kDa ağırlığındaki monomerik bir enzimdir. Koelenterazin, hücre içine serbestçe girebilme özelliğine sahiptir ve üzerinde bazı kimyasal modifikasyonlar yapılarak, lusiferaz ile etkileşemez hale getirilmiştir. Toksik maruziyet sonrası hücreler üzerine eklenen koelenterazin, canlı hücreler tarafından üzerindeki modifikasyonlar uzaklaştırılmak suretiyle esas formuna döndürülür ve lusiferaz ile etkileşerek okside olup koelenteramide dönüşür. Koelenteramid bileşiği eksite enerji düzeyindedir ve kararlı hale geçerken 480 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon veren mavi renkte ışınım yapar. Ölü hücreler, metabolik aktiviteleri bulunmadığı koelenterazini asıl formuna dönüştüremez ve herhangi bir sinyal oluşumuna yol açamazlar. Oluşan sinyal, canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Bu metotta kullanılan Renilla lusiferazı ile ATP biyoluminesans metodunda kullanılan Firefly lusiferazı arasındaki en önemli fark, Renilla lusiferazının ATP'ye ihtiyaç duymamasıdır. Böylece hücreleri lize etmeye gerek duyulmamakta, gerçek zamanlı inceleme mümkün olmaktadır. Ayrıca bu metodun son test formatında olmayışı, diğer testlerle kombine edilerek daha detaylı sonuç alınabilmesini sağlamaktadır (Duellman ve ark., 2015; Fan ve Wood, 2007; Riss ve ark., 2006; Verhaegen ve ark., 1998). Gerçek zamanlı biyoluminesans testinin dezavantajlarından biri, vasata eklenen prosubstratın, canlı hücrelerce metabolize edilerek bir süre sonra tüketilmesi iken diğerleri, testin yüksek maliyetidir (Riss ve ark., 2016).

## Sonuç

Sitotoksikite testleri, ilaç olması muhtemel ya da toksik etkisi bilinmeyen bir maddenin davranışı hakkında temel bilgiler verir ve daha sonra yapılacak hayvan denemeleri veya klinik denemelere kaynak oluşturur. Bu nedenle, ilgili çalışmalardan elde edilecek verilerin doğruluğu ve güvenilirliği önemlidir. Geçmiş yıllarda, sitotoksikite sonrası hücrelerin

canlılığını değerlendirmek için çok sayıda metot geliştirilmiş ve her metodun kendine göre avantaj ve dezavantajları tanımlanmıştır. Ancak araştırmacılar tarafından halen eski ve çok sayıda dezavantaja sahip metodların (MTT testi gibi), gerek uygulama kolaylığı gerekse maliyetleri dolayısıyla tercih edildiği görülmektedir. Bu sahadaki son gelişmelerden biri olan gerçek zamanlı biyoluminesans görüntüleme, hassasiyetini ve kalitesini ispatlamış bir metot olsa da, gerektirdiği ekipman ve sarf malzemelerin maliyeti dolayısıyla henüz yaygınlaşmamıştır. Birçok araştırmacı, uygun metot seçiminden bahsederken maliyeti de göz önünde bulundurulması gerekli koşullardan biri saymıştır ancak, testlerden elde edilen verilerin önemi göz önüne alındığında, maliyetin ön planda olmaması gerektiği kanısına varılmaktadır. Bir kısım araştırmacılar ise, hassasiyet kaygısını gidermek için çeşitli metodların kombinasyonunu tercih etmiş ve bu durumun güvenilir sonuçlar sunması açısından uygun olduğu düşünülmüştür. Yapılan testlerden elde edilen verilerin kalitesi yalnızca metoda bağlı değil, araştırmacının bilgi ve tecrübesi, kullanılan hücre tipi, ortam sıcaklığı, test belirteci içeriği ve vasat kompozisyonu gibi çok sayıda değişkene bağlıdır. Test sonuçlarındaki başarı, tüm bu değişkenlerin bir arada göz önünde bulundurulmasını gerektirmektedir. Gelecekte, hücre mekanizmaların ve hücre yapısının daha detaylı aydınlatılması ile farklı canlılık belirteçlerinin keşfedileceği ve çok daha hassas derecede tespit yapılabileceği düşünülmektedir.

## Kaynaklar

- Ahmed SA, Gogal RM Jr, Walsh JE, 1994: A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *J Immunol Methods*, 170, 211-224.
- Altman FP, 1976: Tetrazolium salts and formazans. *Prog Histochem Cytochem*, 9(3), 3-6.
- Aravinthan A, Govarthanan M, Selvam K, Praburaman L, Selvankumar T, Balamurugan R, Kamala-Kannan S, Kim JH, 2015: Sunroot mediated synthesis and characterization of silver nanoparticles and evaluation of its antibacterial and rat splenocyte cytotoxic effects. *Int J Nanomedicine*, 1977-1983.
- Barltrop JA, Owen TC, Cory AH, Cory JG, 1991: 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazolyl)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters*, 1, 11, 611-614.
- Borenfreund E, Puerner JA, 1985: Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24(2-3), 119-124.
- Connolly DT, Knight MB, Harakas NK, Wittwer AJ, Feder J, 1986: Determination of the number of endothelial cells in culture using an acid phosphatase assay. *Anal Biochem*, 152, 136-140.
- Crouch SPM, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J, 1993: The use of ATP bioluminescence as a measure cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 160, 81-88.
- Decker T, Lohmann-Matthes ML, 1988: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 15, 61-69.
- Denizot F, Lang R, 1986: Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Methods*, 89, 271-277.
- Duellman SJ, Zhou W, Meisenheimer P, Vidugiris G, Cali JJ, Gautam P, Wennerberg K, Vidugiriene J, 2015: Bioluminescent, nonlytic, real-time cell viability assay and use in inhibitor screening. *Assay Drug Dev Techn*, 13(8), 456-465.
- Erb RE, Ehlers MH, 1950: Resazurin reducing time as an indicator of bovine semen fertilizing capacity. *J Dairy Sci*, 33(12), 853-864.
- Fan F, Wood KV, 2007: Bioluminescent assays for high-throughput screening. *Assay Drug Dev Techn*, 5, 1, 127-136.
- Feoktistova M, Geserick P, Leverkus M, 2016: Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harbor Protocol*, DOI:10.1101/pdb.prot087379.
- Galluzzi L et al, 2009: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 16, 1093-1107
- Gilbert DF, Boutros M, 2016: A protocol for a high-throughput multiplex cell viability assay. *Methods Mol Biol*, 1470, 75-84
- Held P, 2004: Luciferase Measurements Using the Clarity™ Luminescence Microplate Reader. <http://www.biotek.com/resources/articles/luciferase-measurements-plate-reader.html>, Erişim tarihi; 29.12.2016.
- Ishiyama M, Tominaga H, Shiga M, Sasamoto K, Ohkura Y, Ueno K, Watanabe M, 1995: Novel cell proliferation and cytotoxicity assays using a tetrazolium salt that produce formazan dye. *In Vitro Toxicology*, 8, 187-190.
- Korzeniewski C, Callewaert DM, 1983: An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64, 313-320.
- Lappalainen K, Jääskeläinen I, Syrjänen K, Urtili A, Syrjänen S, 1994: Comparison of cell proliferation and toxicity assays using two cationic liposomes. *Pharm Res*, 11(8), 1127-1131.

- Lomakina GY, Modestoca YA, Ugarova NN, 2015: Bioluminescence assay for cell viability. *Biochemistry (Mosc)*, 80(6), 701-713.
- Longo-Sorbello GSA, Saydam G, Banerjee D, Bertino JR, 2006: Cytotoxicity and cell growth assays. In "Cell biology: a laboratory handbook", Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
- Martin A, Clynes M, 1993: Comparison of 5 microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology*, 11, 49-58.
- Mossman T, 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- Niles AL, Moravec RA, Hesselberth PE, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL, 2007: A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal Biochem*, 336, 2, 197-206.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F, 2000: Investigation of the alamar blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Federation Of European Biochemical Societies*, 267, 17, 5421-5426.
- O'Connor R, Heenan M, Duffy C, Clynes M, 1998: Miniaturized in vitro methods in toxicity testing. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.
- Paull KD, Shoemaker RH, Boyd MR, Parsons JL, Risbood PA, Barbera WA, Sharma MN, Baker DC, Hand E, Scudiero DA, Monks A, Alley MC, Grote M, 1988: The synthesis of XTT: A new tetrazolium reagent that is bio-reducible to a water-soluble formazan. *J Heterocyclic Chem*, 25, 911-914.
- Petty RD, Sutherland LA, Hunter EM, 1995: Comparison of MTT and ATP-based assays for the measurement of viable cell number. *Luminescence*, 10, 1, 29-34.
- Riss T, Moravec R, 2002: Introducing the CytoTox-ONE™ homogeneous membrane integrity assay. *Promega Notes*, 82, 15-18.
- Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellmann S, Benink HA, Worzella TJ, Minor L, 2016: Assay guidance manual: cell viability assays. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/?report=reader#!po=1.16279>, Erişim tarihi; 21.12.2016.
- Riss TL, Moravec RA, O'Brien MA, Hawkins EM, Niles A, 2006: Homogeneous multiwell assays for measuring cell viability, cytotoxicity, and apoptosis. In "Handbook Of Assay Development In Drug Discovery", Ed; Minor LK, CRC Press, Florida, USA.
- Riss TL, Moravec RA, 2006: Cell proliferation assays: improved homogeneous methods used to measure the number of cells in culture. In "Cell Biology", Ed; Celis JE, Elsevier Academic Press, Burlington.
- Riss TL, Moravec RA, 2004: Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Techn*, 2, 1, 51-62.
- Sali N, Nagy S, Poór M, Köszegi T, 2016: Multiparametric luminescent cell viability assay in toxicology models: A critical evaluation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 79, 45-54.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Kenneth DP, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR, 1988: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res*, 48, 4827-4833.
- Silva FSG, Starostina IG, Ivanova VV, Rizvanoz AA, Oliveira PJ, Pereira SP, 2016: Determination of metabolic viability and cell mass using a tandem resazurin/sulforhodamine B assay. *Curr Protoc Toxicol*, 68, 2.24.1-2.24.15 DOI: 10.1002/cptx.1.
- Squatrito RC, Connor JP, Buller RE, 1995: Comparison of a novel redox cell growth assay to the ATP bioluminescence assay. *Gynecol Oncol*, 58, 101-105.
- Tominaga H, Ishiyama M, Ohseto F, Sasamoto K, Hamamoto T, Suzuki K, Watanabe M, 1999: A water-soluble tetrazolium salt useful for colorimetric cell viability assay. *Analytical Communications*, 36, 47-50.
- Verhaegen S, Coyle S, Connolly LM, O'loughlin, Clynes M, 1998: Cell cycle and cell death mechanism. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.
- Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A, 2005: A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int J Pharm*, 288, 369-376.
- Zucco F, Angelis DI, Stamatii A, 1998: Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.

**\*Yazışma Adresi:** Orhan TOKUR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.  
e-mail: orhantokur@gmail.com

## HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ YAYIN KURALLARI \*

1- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi (Harran Üniv Vet Fak Derg), Veteriner Hekimliği bilim alanı ile ilgili olmak üzere insan ve hayvan sağlığını kapsayan Türkçe ve İngilizce olarak hazırlanmış orijinal klinik ve deneysel araştırmalar, olgu sunumları, derlemeler, kısa bilimsel makale ve editöre mektuplar yayınlayan hakemli bir dergidir. Dergi 6 ayda bir, yılda 2 sayı olarak yayınlanır. Yayınlanan makalelerden ücret alınmamaktadır.

2- Dergiye kabul edilen yayınlar başka bir yerde yayınlanmamış olmalıdır. Yayınlanan makalelerden doğacak her türlü hukuki ve cezai sorumluluk yazarlara aittir. Yazarlara yayın hakkı bedeli ödenmez. Gönderilen makaleler yayınlansın veya yayınlanmasın geri iade edilmez.

3- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, etik ilkelere saygı çerçevesinde, TÜBİTAK ULAKBİM tarafından Türkiye'de tüm üniversitelerin kullanımına açmış olduğu "ithenticate" intihal tespit programı aracılığıyla gönderilen tüm makale, olgu sunumu ve derlemelerin ön değerlendirmesini yapmaktadır. Bu ön değerlendirme sonuçlarına göre, makale, olgu sunumu veya derlemelerin başka kaynaklarla benzerlik oranının %23'ü (özet, abstract ve kaynaklar hariç) aşmaması gerekmektedir. "ithenticate" programı aracılığı ile yapılacak ön değerlendirmede benzerlik oranının %23 değerini aşması durumunda yayımlanmak üzere Dergimize gönderilen makale, olgu sunumu veya derlemeler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

4- Dergiye sunulan çalışmaların etik kurallara uygun olarak yapılması sorumluluğu yazarlara aittir. Bununla beraber editör, gerektiğinde yazarlardan etik kurul belgesi isteme hakkını saklı tutar.

5- Makale yayına kabul edildiği takdirde her türlü yayın hakkının devredildiğine dair beyanları kapsayan Telif Hakkı Devir Sözleşmesinin tüm yazarlar tarafından imzalanarak basımdan önce elektronik olarak dergi editörlüğüne gönderilmesi gerekmektedir. Telif Hakkı Devir Sözleşmesi gönderilmeyen makaleler yayımlamaya kabul edilmiş olsalar bile basılmazlar.

6- Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne gönderilecek makale, olgu sunumu, derleme vb. çalışmalar Dergipark üzerinden <http://dergipark.gov.tr/huvfd> linki kullanılarak değerlendirme sürecine alınmaktadır.

### YAZIM KURALLARI

Yazılar, MS Word formatında, Times New Roman yazı tipinde, 12 punto, çift satır aralıklı ve her kenardan 2.5 cm boşluk bırakılarak hazırlanmalıdır. Bu şekildeki yazılar, şekil ve tablolar dâhil olmak üzere orijinal bilimsel araştırmalar ve derlemelerde 15, kısa bilimsel makale ve olgu sunumlarında 5 sayfayı geçmemelidir.

Birimler ve ölçüler için Uluslararası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır.

**Araştırma Makaleleri:** Orijinal araştırma makaleleri aşağıdaki ana konu sıralamasına göre dizilmelidir: Başlık, Yazar adları (Sorumlu yazar (\*) ile işaretlenmeli), Yazar adresleri, Özet ve Anahtar kelimeler (3 - 6 kelime), İngilizce başlık, Abstract ve Keywords ile Giriş, Materyal ve Metot, Bulgular, Tartışma ve Sonuç, Teşekkür veya Bilgilendirme ile Kaynaklar. Her bir Tablo ve Şekil ayrı sayfalarda yer almalıdır.

### YAZIM DÜZENİ

**Özet:** Orijinal araştırma makalelerinde 250, diğer makale türlerinde 200 kelimeyi geçmeyecek şekilde hazırlanmalıdır.

**Anahtar Kelimeler:** En fazla 6 tane olmak üzere her iki dildeki özetin altında verilmelidir. Anahtar kelimeler, Türkiye Bilim Terimleri arasından seçilmelidir. Anahtar kelimelerin seçiminde Türkiye Bilim Terimleri internet adresinden (<http://www.bilimterimleri.com>) yararlanılmalıdır.

**Giriş:** Sonuçların anlaşılabilirliği ve yorumlanabilirliği için o konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalar hakkında bilgilere yer verilmelidir. Giriş'te çalışmanın hipotezi belirtilmelidir. Çalışmanın amacı bu bölümün en sonunda açık olarak yazılmalıdır.

**Materyal ve Metot:** Bu bölümde deneysel çalışmalar diğer araştırmacılar tarafından tekrarlanabilecek yeterlilikteki detayı ile verilmelidir. Uluslar arası indeksli dergilerde yayınlanmış bir makalede açıklanan bir teknik kullanıldığında, metodun çok kısa açıklanması ve ilgili orijinal makaleye atıf yapılması gereklidir. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne yayınlanmak amacıyla gönderilen bilimsel çalışmalarda "**etik kurul onayı**" zorunluluğu ve gerekliliği var ise, etik kurul onay/izin belgesinin "alındığı etik kurulun ismini, sayısını ve tarihini" içeren açıklayıcı bilgilerin materyal ve metot bölümünde açıkça belirtilmesi gerekmektedir.

**Bulgular:** Araştırma bulguları açık ve anlaşılabilir şekilde verilmelidir. Bulgular, gerektiğinde tablo ve şekillerle desteklenerek kısa olarak sunulmalıdır.

**Tartışma ve Sonuç:** Bulgular gereksiz ayrıntıya girmeden literatürler ışığında tartışılmalı ve bulguların önemi vurgulanmalıdır. Sonuç ya da öneri cümlesi ile bitirilmelidir.

**Teşekkür:** Çalışma veya makaleye kişisel katkı ve parasal destek burada belirtilmelidir.

**Derleme:** Derginin yayın alanlarındaki konularda yenilikleri içeren, güncel kaynaklardan yararlanılarak hazırlanmış makaleler olup, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nde değerlendirmeye alınan ve yayınlanan derlemeler çağrılı derlemelerden oluşmaktadır. Derlemelerde; Özet, Giriş, Sonuç ve Kaynaklar bölümleri bulunmalıdır.

**Olgu Sunumu:** Yazarların, karşılaştıkları yeni veya ender gözlemlenen olguların ele alındığı, bilimsel değere sahip bilgileri içeren eserlerdir. En fazla 15 kaynak kullanılmalı ve bu kaynakların güncel olmasına özen gösterilmelidir. Olgu sunumları; Özet, Giriş, Olgu tanımı, Tartışma ve Sonuç ile Kaynaklar bölümlerinden oluşmalıdır.

**Kısa Bilimsel Makale:** Kısa bilimsel makalelerde dar kapsamlı olarak ele alınmış, yeni bilgi ve bulgular sunulmalıdır. Araştırma makalesi formatında hazırlanmalı ve en fazla 5 sayfa olmalıdır. En fazla 2 tablo veya şekil içermelidir.

#### **Kaynaklar**

Metin içinde atıf yapılırken yazar veya yazarların soyadından sonra parantez içinde kaynağın yayın yılı belirtilmelidir [Örnekler: Adams (1998) tarafından; Wilkie ve Whittaker (1997) tarafından; Doyle ve ark. (2007) tarafından... ]. Cümlelerin sonunda atıf yapıldığında ise yazar ismi ve yayın yılı parantez içinde belirtilmelidir. [Örnekler: ... bildirilmiştir (Adams, 1998); .... bildirilmiştir (Wilkie ve Whittaker, 1997); ..... bildirilmiştir (Doyle ve ark., 2007)]. Birden çok kaynağa atıf yapılması durumunda önce alfabetik sonra kronolojik sıralama yapılmalıdır. [Örnekler: .... bildirilmiştir (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle ve ark., 2007; Wilkie ve Whittaker, 2006)]. Aynı yazarın aynı yıl yayınları söz konusu ise her biri "a" harfinden başlayarak küçük harflerle işaretlenmelidir. [Örnek: .... (Adams, 2005a; Adams, 2005b;...)].

Yazarı belli olmayan Web adresleri (Anonim, erişim yılı) şeklinde belirtilir.

**Kaynak listesi aşağıdaki şekilde hazırlanmalıdır:**

**Makale;** Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292, 64-68.

**Kitap;** Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Kitaptan bir bölüm:** Bernstein PS, Katz NB, 2001: The role of ocular radicals in age-related macular degeneration. In "Environmental Stressor in Health and Disease", Ed; Fuchs J and Packer L, Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Web sayfası:** Anonim, 2010: <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2010.

Bozkaya F, 2011: Biyoteknoloji ve Gen Mühendisliği. <http://www.emea.europa.eu>, Erişim tarihi; 01.04.2011.

**Tez:** Er A, 2009: Makrolid grubu antibiyotiklerin endotoksemide sitokin düzeylerine etkisi. Doktora tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

**Bilimsel toplantıda sunulan bildiri:** Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp. 27-28.

**Tablo ve Şekiller:** Her bir tablo ve şekil ayrı sayfalara yerleştirilmelidir. Kullanım sırasına göre numaralandırılmalı, kısa başlıklarla ifade edilmeli ve metin içinde tablo numarası verilerek atıfta bulunulmalıdır. Tablo başlıkları makalenin yazım dilinde tablonun üst bölümüne yazılmalıdır. Tabloda kullanılan kısaltmalar ve gerekli açıklamalar tablo altında verilmelidir. Şekil başlıkları makalenin yazım dilinde şeklin alt bölümüne yazılmalıdır. Elektronik posta ile gönderilecek olan eserlerde yer alan tüm resimler en az 600 dpi çözünürlükte, TIFF veya JPEG formatında kaydedilmiş olmalıdır.

\* **Not:** Dergimize makale gönderimi yalnızca Dergipark üzerinden <http://dergipark.gov.tr/huvfd> linki kullanılarak yapılmaktadır.

## INSTRUCTION for AUTHORS of JOURNAL of HARRAN UNIVERSITY FACULTY of VETERINARY MEDICINE\*

1- The Journal of the Faculty of Veterinary Medicine, University of Harran (Harran Univ (HRU) Vet Fak Derg) publishes original clinical and experimental research, case reports, reviews, preliminary report and Letters to Editor concerned with all aspects of veterinary sciences in Turkish and English.

The journal is published as 2 issues per year. There is no publication charge.

2- Papers are accepted for publication on the understanding that they have not been published and are not currently considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors. No copyright fee is paid to authors.

3- In frame of the respect to ethical principles, Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine makes preliminary evaluations of all articles and case reports for plagiarism by using the program "ithenticate" made available by TUBITAK ULAKBIM to all universities. Therefore similarity index of the articles, case reports or reviews should not exceed 23% (Turkish abstract, abstract and references are excluded). When the similarity index detected via "ithenticate" program exceeds 23%, the articles case reports or reviews sent to our journal for publishing will not be further evaluated and returned to the author.

4- Ethical responsibility of all research submitted to the journal for publication belongs to the author(s). However, the Editor reserves the right to ask author(s) for an approval letter given by local ethics committee.

5- If the paper is accepted for publication the Copyright Transfer Agreement Form should be signed by all co-authors and the scanned form should be sent to the Editor by e-mail before publication. The article will not be published until the Copyright Transfer Agreement Form is received.

6- Submission to Harran University Journal of Faculty of Veterinary Medicine proceeds on-line through Dergipark by using the link <http://dergipark.gov.tr/huvfd>.

### Preparation of Manuscript

Papers submitted for publication should be written using MS Word 2007 or upper version in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all margins. Original papers and reviews should not exceed 15 pages and case reports should not exceed 5 pages including tables, figures and graphs.

International Standard Unit (SI System) should be used for units and abbreviations.

**Research Articles:** Original research articles should be lined up as; Heading (Turkish), Authors names (corresponding author should be remarked with (\*), authors addresses, Abstract (Turkish) and Keywords (Turkish) (3-6 phrases), English heading, Abstract (English) and Keywords (English), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusions, Acknowledgement and References. If the paper is written in English; firstly English heading, author(s) name(s), author(s) address(es), Abstract (English) and Keywords (English); Turkish heading, Abstract (Turkish) and Keywords (Turkish) should be lined up and the rest of the article should be in English. Tables and Figures should be printed on separate pages.

### Writing order:

**Abstract:** Abstracts should not exceed 250 words in original articles and 200 words in other kind of articles.

**Keywords:** Keywords should be 6 at maximum and written at the bottom of the summaries in both languages. Keywords should be chosen from Turkish Scientific Terms. These terms can be obtained from internet address of Turkish Scientific Terms (<http://www.bilimterimleri.com>).

**Introduction:** This section should supply pertinent background information for understanding and interpretation of the results the hypothesis and the aim of the study should be clearly given at the end of this section.

**Materials and Method:** This section should describe the experimental procedures in sufficient detail to allow other scientists to repeat the experiment. Where techniques that have already been described in an indexed journal are used, this section may be concise and only provide relevant references. For studies requiring an approval of ethics committee, informations on the name of the ethics committee and the date and the number of the approval should be given in this section.

**Results:** The results section should provide data that are concisely explained, when required by including tables or figures.

**Discussion:** The results of the study should be discussed based on the literature and the importance of the findings should be stated. This section should be finished by concluding statements.



**Acknowledgements:** Any additional information concerning funding and personal contributions to the study or manuscript should be noted.

**Reviews:** Review articles aim to provide accessible, authoritative overviews in a field or topic. Harran University Journal of Faculty of Veterinary Medicine considers only invited reviews for publication. Reviews must contain following sections; abstract, introduction which can include sub sections, conclusions and references.

**Case reports:** Author(s) must prefer rare and original cases include scientific point of view. Case reports should not exceed 5 pages (excluding title page), and should not use more than 15 references. Case reports should include "Abstract, Introduction, Case, Results and Discussion as well as References" sections.

**Short Communication:** Short Communications should concisely presents results of a limited investigation they should be prepared in the form of original articles and not exceed 5 journal pages including figures, tables and references. They should include at most 2 figures and tables.

### References

All references in the text must be given by author's surname and year of publication enclosed in round brackets [Example: Adams (1998) reported that...; Wilkie and Whittaker (1997) reported that..., Doyle et al. (2007) reported that... or It has been reported that... (Adams (1998); It has been reported that..." (Wilkie and Whittaker (1997); It has been reported that... (Doyle et al., 2007)]. Citations should be arranged in alphabetical order and then chronologically. [Example: It has been reported that... (Adams, 1998; Adams, 2008; Doyle et al., 2007; Wilkie and Whittaker, 2006)]. Publications by the same author(s) in the same year should be identified with a, b, c after the year of publication. [Example: It has been reported that... (Adams, 1998a; Adams, 1998b) Web address should be referenced as anonym. For example Anonym 2010. Only official web pages should be used.

The list of references should be prepared as follows:

**Article;** Sullivan JC, Sasser JM, Pollock JS, 2007: Sexual dimorphism in oxidant status in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol*, 292, 64-68.

**Book;** Cadenas E, Packer L, 2001: Handbook of Antioxidants. 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, USA.

**Section in a Book:** Bernstein PS, Katz NB, 2001: The role of ocular radicals in age-related macular degeneration. In "Environmental Stressor in Health and Disease", Ed; Fuchs J and Packer L, Marcel Dekker Inc., New York USA.

**Web page:** Anonym 2010. <http://www.emea.europa.eu/> Accession date; 01.04.2010.

Bozkaya F, 2011: Biotechnology and Genetical Engineering. <http://www.emea.europa.eu/> Erişim tarihi; 01.04.2011.

**Thesis:** Er A, 2009: Effect of macrolide antibiotics on cytokine levels in endotoxemia. PhD thesis, SU Institute of Health Sciences, Konya.

**Proceedings abstracts:** Allen WR, Wilsher S, Morris L, Crowhurst JS, Hillyer MH, Neal HN, 2006: Re-establishment of oviducal patency and fertility in infertile mares. In: Proceedings of the Ninth International Symposium on Equine Reproduction, Kerkrade, Holland, pp.27-28.

**Tables and Figures:** Tables and Figures should be printed on separate pages. Each table and figure should have a brief and self explanatory title and should be consecutively numbered with Arabic numbers. The text should include references to all tables and figures. The title of each table should be written above the table. Abbreviations and explanations used in the table should be placed at the bottom of the table.

Photographs should be of high quality. If manuscript is submitted by electronic mail, images must be scanned in a resolution of at least 600 dpi and submitted in JPEG or TIFF format. Offprints of the journal will be in black and white.

\*: Submission to Harran University Journal of Faculty of Veterinary Medicine proceeds on-line through Dergipark by using the link <http://dergipark.gov.tr/huvfd>.

# HARRAN ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ DERGİSİ

## TELİF HAKKI DEVİR FORMU

Harran Üniversitesi

Veteriner Fakültesi Dergisi Editörlüğüne

Biz aşağıda adı, soyadı ve imzaları bulunan yazarlar, tarafımızdan yazılmış,

.....  
.....

İsimli makalenin içeriği, sonuçları ve yorumları konusunda, Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'nin hiç bir sorumluluk taşımadığını kabul ederiz. Sunduğumuz makalenin orijinal olduğunu, herhangi bir başka dergiye yayınlanmak üzere gönderilmediğini, daha önce yayınlanmadığını beyan ederiz. Makalenin telif hakkından feragat etmeyi kabul ederek sorumluluğu üstlenir ve imza ederiz. Makalenin telif hakkı Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi'ne devredilerek yayınlanması konusunda yetkili kılınmıştır.

Bununla birlikte yazarların aşağıdaki hakları saklıdır:

1. Telif Hakkı dışında kalan patent v.b. bütün tescil edilmiş haklar.
2. Yazarın gelecekteki kitaplar ve dersler gibi çalışmalarında; makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı.
3. Makaleyi ticari amaçlarla kullanmamak koşulu ile çoğaltma hakkı.

Yazarın Adı ve Soyadı

Tarih

İmza

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**İlk isim yazarın yazışma adresi:**

.....  
.....

Telefon: ..... Fax: ..... E-mail: .....@.....

(Formu doldurup tarayıcıda taradıktan sonra, [harranvet@gmail.com](mailto:harranvet@gmail.com) adresine gönderiniz.)

**COPYRIGHT TRANSFER FORM**

We grant that Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has no responsibility for the content, results and conclusions of the manuscript entitled,

.....  
.....

We state that the submitted manuscript is original, has not been published or is not being considered for publishing elsewhere. We grant to disclaim the copyright and sign this form by undertaking all responsibility. Hereby Harran University Journal of the Faculty of Veterinary Medicine has been authorized for publishing by transferring the copyright of the manuscript.

However the following rights of the author(s) are reserved:

1. All other rights such as patent right
2. The rights for using the manuscript as a whole or a part in their future works such as books or lectures without paying any charge,
3. The rights for reproducing the manuscript for purposes other than commercial use.

**Name and Surname of the Author**

**Date**

**Signature**

.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....
.....	.....	.....

**Address of the Corresponding Author:**

.....  
.....

Phone: ..... Fax: ..... E-mail: .....@.....

Send the form to e-mail address [harranvet@gmail.com](mailto:harranvet@gmail.com) after filling it.

