



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2018, 11 (1), March



ISSN: 1308-1594  
e-ISSN: 2147-6853

<http://www.kvj.aku.edu.tr>

**DergiPark**  
AKADEMİK



**ADVISORY BOARDS**

**Publisher**

Prof. Dr. Erkan KARADAŞ  
Dean  
On behalf of Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine  
Afyonkarahisar - TURKEY

**Editor in Chief**

Prof. Dr. Esmâ KOZAN

**Editors**

Assoc. Prof. Dr. Musa KORKMAZ  
Assist. Prof. Dr. Recep KARA

**Organising Committee**

Assoc. Prof. Dr. Mine DOŞAY AKBULUT  
Assoc. Prof. Dr. C. Çağrı ÇINGİ  
Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ  
Assist. Prof. Dr. Murat TANDOĞAN  
Assist. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

Prof. Dr. Arif Altuntaş	Ankara University -Turkey
Prof. Dr. Atilla Şimşek	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Cevdet Uğuz	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Yavuz O. Birdane	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Demirkan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İlhami Çelik	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. İsmail Bayram	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Abdullah Kaya	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Mustafa Alışarlı	Ondokuz Mayıs University-Turkey
Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Recep Aslan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu	Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Yahya Kuyucuoğlu	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Zafer Karaer	Ankara University-Turkey
Prof. Dr. Zehra Bozkurt	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Taşal	Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Şule Kaya	Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Korhan Altunbaş	Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Aysun Demirkan	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Fatih M. Birdane	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak	Adnan Menderes University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Hasan Çiçek	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Zeki Gürler	Afyon Kocatepe University-Turkey
Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt	Afyon Kocatepe University-Turkey

*Kocatepe Veterinary Journal is International an Peer-Reviewed Journal and published four times a year.*

*Kocatepe Veterinary Journal;*  
*indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Disin Journal Index, Academic Index, Turkey Citation Index, Index Copernicus, SIS (Scientific Indexing Services), Google Scholar*

*Addressed:*

*Kocatepe Veterinary Journal, Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, 03200, Afyonkarahisar, TURKEY.*

*Tel: +90 272 214 9309 Fax: +90 272 214 9309 E-mail: kvj@aku.edu.tr*

**[www.kvj.aku.edu.tr](http://www.kvj.aku.edu.tr)** **<http://dergipark.gov.tr/kvj>**

***\*Only accepts online submission\****

**RESEARCH ARTICLES**

- Türkiye’de Canlı Sığır ve Sığır Eti İthalatındaki Gelişmeler ve Üretici Fiyatlarının Trend Modelleri ile İncelenmesi** (*Developments in Live Cattle and Beef Import and the Analysis of Producer Prices with Trend Models in Turkey*) **1-10**  
Hasan Çiçek, İlkey Doğan
- First Report of *Escherichia coli* O157 From Traditional Turkish Dairy Product Kaymak** (*Geleneksel Türk Süt Ürünü Kaymaktan Escherichia coli O157'nin İlk Bildirimi*) **11-17**  
Didem Sağlam, Esra Şeker
- Işık Mikroskopik Bir Çalışma: Devede Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku** (*A Light Microscopic Study: Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in Camel*) **18-23**  
Ahmet Ceylan
- Neonatal İshalli Buzağularda İki Farklı Hematokrit Ölçüm Tekniğinin Karşılaştırılması** (*Comparison of two Hematocrite Measurement Methods in Diarrheic Neonatal Calves*) **24-29**  
Hasan Erdoğan, Mehmet Gültekin, Serdar Paşa, Kerem Ural
- Estimation of Volume of Ox Brain and Gray and White Matter with Cavalier’s Principle** (*Sığırlarda Beyin, Ak Madde ve Gri Maddenin Cavalieri Prensipli ile Hacim Hesaplamaları*) **30-34**  
Durmuş Bolat
- The Effects of Liquid Dishwashing Detergent Exposure in Male Swiss Albino Mice** (*Swiss Albino Erkek Farelerde Sıvı Bulaşık Deterjanı Maruziyetinin Etkilerinin İncelenmesi*) **35-39**  
Özlem Yıldız Gülay, Ayhan Ata, Ahu Demirtaş, Şükrü Güngör, Mehmet Şükrü Gülay
- Investigating The Usage of Molted Feather Samples as a DNA Source with Two Methods in Gender Identification of African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*) by Molecular Analyses of CHDW And CHDZ Genes** (*Afrika Gri Papağanlarına (Psittacus erithacus) Ait Dökülmüş Tüy Örneklerinin İki Yöntem İle DNA Kaynağı Olarak CHDW ve CHDZ Genlerinin Moleküler Analizi İle Cinsiyet Tanımlamasında Kullanımının Araştırılması*) **40-44**  
Kozet Avanus, Lora Koenhemi
- Canine Visceral Leishmaniasis’in Farklı Evrelerinde Ekokardiyografik Ejeksiyon Fraksiyonu ve Fraksiyonel Kısalmanın Değerlendirilmesi** (*Assessment of Echocardiographic Ejection Fraction and Fractional Shortness at Different Stages of Canine Visceral Leishmaniasis*) **45-52**  
Canberk Balıkcı, Kerem Ural
- Atak-S ve Isa Brown Tavukları Arasındaki Genetik Çeşitliliğin SSR Belirteçleri ile Tahmini** (*Estimated Genetic Diversity Between Atak-S and Isa Brown Chickens with SSR Markers*) **53-62**  
Selçuk Özdemir, Harun Arslan, Uğur Özentürk, Fatih Yıldırım, Ahmet Yıldız
- Köpeklerde Dış Kulak Yolu Hastalıklarının Video - Otskopik, Ultrasonografik ve Radyografik Yöntemlerle Belirlenmesi** (*Determination of External Ear Canal Problems Using Radiographic, Ultrasonographic and Video-Otoscopic Methods*) **63-69**  
Nusret Apaydın, Özge Hasandayıoğlu
- Koçlarda Bazı Androlojik Parametrelerin ve Biyokimyasal Özelliklerin Mevsimle İlişkisi** (*Some Andrological Parameters and Biochemical Properties in Relation to Season in Rams*) **70-85**  
Deniz Yeni, Mustafa Gündoğan
- REVIEWS**
- İnfeksiyonların Tanısında En Çok Kullanılan İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri** (*Isothermal Amplification Methods Most Used in the Diagnosis of Infections*) **86-95**  
Mehmet Üvey, Nilgün Ünal
- Apoptotic and Non-Apoptotic Effects of Granzyme** (*Granzimlerin Apoptotik ve Non-Apoptotik Etkileri*) **96-103**  
Ercan Keskin, Durmuş Hatipoğlu

## Türkiye’de Canlı Sığır ve Sığır Eti İthalatındaki Gelişmeler ve Üretici Fiyatlarının Trend Modelleri ile İncelenmesi

Hasan ÇİÇEK<sup>1\*</sup>, İlkay DOĞAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE  
<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, TÜRKİYE

\*Corresponding author e-mail: hascicek@hotmail.com

### ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye’de canlı sığır ve sığır eti ithalatındaki gelişmeler değerlendirilmiş, cari ve sabit sığır eti ve besi yemi fiyatları trend modelleri ile incelenmiştir. Çalışmanın materyali, 2010-2016 yılları arasındaki canlı sığır ve sığır eti ithalatları (miktar ve değer), 1998-2017 yılları arasındaki cari besi yemi ve sığır eti üretici fiyatları ve aylık üretici fiyatları endeksidir. Cari fiyatlar aylık üretici fiyatları endeksi kullanılarak sabit fiyatlara dönüştürülmüştür. Trend analizi kapsamında 2018-2020 dönemi için fiyat tahminleri yapılmıştır. İncelenen dönemde besi yemi ve sığır eti üretici fiyatlarının cari olarak yaklaşık 17 kat artmasına rağmen, reel olarak her ikisinin de düştüğü belirlenmiştir. Canlı sığır ve sığır eti ithalatının iç piyasadaki fiyatları kısmen etkilediği, yıllar içerisinde döviz kurundaki değişimin ithalatın maliyetine yansıdığı ve yem fiyatlarındaki artışın sığır eti üretici fiyatları üzerinde daha fazla baskı oluşturduğu belirlenmiştir. Trend analizi doğruluk ölçütlerine göre sığır eti ve yem fiyatları için karesel (quadratic) model tercih edilmiştir. Buna göre; sığır etinde 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (26,13 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar reel olarak yaklaşık %18 artış olacağı (30,78 TL/Kg) tahmin edilmiştir ( $Y=29,93-1,003t+0,0452t^2$ ). Besi yeminde ise 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (0,90 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar reel olarak yaklaşık %31 artış olacağı (1,18 TL/Kg) tahmin edilmiştir ( $Y=1,056-0,047t+0,0023t^2$ ).

**Anahtar Kelime:** Sığır eti, ithalat, üretici fiyatları, trend analizi, Türkiye

### Developments in Live Cattle and Beef Import and the Analysis of Producer Prices with Trend Models in Turkey

#### ABSTRACT

In this study, developments in live cattle and beef import evaluated and current and fixed beef prices and fattening feed prices were analyzed by trend models in Turkey. Study materials are live cattle and beef imports (quantity and value) between 2010-2016 years, current fattening feed and beef producer prices between 1998-2017 years and monthly producer prices index. Current prices have been converted to fixed prices using the monthly producer prices index. Within the scope of trend analysis, price estimates were made for 2018-2020 period. Although the current fattening feed prices and beef producer prices have increased by about 17 times in the period examined, it has been determined that both are falling in real terms. It has been determined that live cattle and beef imports partially affect domestic market prices, changes in exchange rates over the years reflected the cost of imports, and the increase in feed prices puts more pressure on beef producer prices. A quadratic model has been chosen for beef and feed prices according to trend analysis accuracy criteria. According to this; when the average price of beef from January to September 2017 (26,13 TL/Kg) is considered; it is estimated to increase by about 18% (30,78 TL/Kg) in real terms until the end of 2020 ( $Y=29,93-1,003t+0,0452t^2$ ). When the average price of fattening feed is taken into consideration from January to September 2017 (0,90 TL/Kg); it is estimated to increase by about 31% (1,18 TL/Kg) in real terms until the end of 2020 ( $Y=1,056-0,047t+0,0023t^2$ ).

**Key Words:** Beef, import, producer prices, trend analysis, Turkey

To cite this article: Çiçek H, Doğan İ. Türkiye’de Canlı Sığır ve Sığır Eti İthalatındaki Gelişmeler ve Üretici Fiyatlarının Trend Modelleri ile İncelenmesi. *Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 1-10.*

## GİRİŞ

Dünya'da tarımsal üretim değeri (canlı hayvanlar hariç) 1998-2014 yılları arasında %175 artarak 3,1 trilyon Amerikan Doları (USD)'na ulaşmıştır. Bu değer içinde temel hayvansal ürünlerden; et (domuz, kanatlı, büyükbaş ve küçükbaş), süt (büyükbaş ve küçükbaş) ve yumurtanın payı %37,75'tir. Etin hayvansal ürünler içindeki payı %59,28 iken, toplam tarımsal üretimdeki oranı %22,39'dur. Dolayısıyla etin dünya tarım ve hayvancılık sektöründe ciddi bir katma değeri olduğu söylenebilir. Toplam et üretim değerinde domuz %35,73, kanatlı (piliç+hindi) %28,69, büyükbaş (sığır+manda) %26,57 ve küçükbaş (koyun+keçi) %9,01 pay almıştır. Son yıllarda domuz, kanatlı ve küçükbaşın toplam et üretim değerindeki payı 1998 yılına göre artarken, büyükbaşta özellikle sığırın oranı yaklaşık %1,5 düşmüştür (FAO, 2017).

Üretim miktarları açısından bakıldığında; 2016 yılında dünyada üretilen toplam etin (319,8 milyon ton) hayvan türleri açısından sıralaması üretim değerinde olduğu gibidir. Domuz %36,41 ile ilk sırayı alırken, bunu kanatlı (%36,19), büyükbaş (%21,19) ve küçükbaş (%4,41) izler. Üretimdeki en fazla artış 1998 yılına göre kanatlıda (%100) görülürken, en az artış büyükbaşta (%19), özellikle sığırda meydana gelmiştir. Sığır eti, 1998 yılında hem üretim değeri hem de üretim miktarı açısından piliç etinin önünde iken, günümüzde üçüncü sıraya düşmüştür. Diğer taraftan, 1990'lı yıllarda küresel et ticaretinin %50'sini sığır eti oluştururken, günümüzde bu oran %30'a kadar gerilemiştir. Bu durumun gerçekleşmesinde; domuz ve kanatlı eti maliyetlerinin nispi olarak sığır etine göre düşmesi yanında, hayvan hastalıkları ve gıda güvenliği sorunları (BSE vb.) da etkili olmuştur. Neticede kişi başına sığır eti tüketimi (6,5 kg), kanatlı (13,7 kg) ve domuz eti tüketiminin (12,4 kg) de gerisinde kalmıştır (ESK, 2016; GTHB, 2015).

Türkiye'de ise dünyadaki duruma benzer şekilde, etin hem tarımsal (%25,82) hem de hayvansal ürünler üretim değeri içinde (%57,16) önemli bir katma değeri bulunmaktadır. Toplam et üretim değerinde kırmızı etin ağırlığı (%65,89) oldukça yüksektir (FAO, 2017). Üretim miktarı açısından incelendiğinde ise, 2016 yılı toplam kırmızı et üretimi (1,17 milyon ton), toplam kanatlı et üretiminin (2,1 milyon ton) gerisinde yer almıştır. Kanatlı et üretimi ve dış ticaretinde dünyada önemli bir konuma ulaşan Türkiye'de kırmızı et sektörü arzulan seviyede değildir. Kırmızı etin tamamı büyükbaş ve küçükbaş hayvan türlerinden (sığırın payı %90) sağlandığı için, domuz eti dışındaki 2016 yılı dünya kırmızı et üretiminde (81,9 milyon ton) Türkiye'nin payı %1,4'tür. Mevcut durumda ülke nüfusu ve kişi başı gelir artmakta, kırmızı et talebi yükselmekte ancak üretim yetersiz

kalmaktadır. Özellikle hayvan besleme maliyetleri ciddi bir dezavantaj oluşturmakta ve bu durum ürün fiyatlarına yansımaktadır. Sonuç olarak, Türkiye'de yıllık kişi başına kırmızı et tüketim değerleri halen birçok ülkenin gerisindedir (ESK, 2016; TÜİK, 2017; BESD-BİR, 2017).

Kırmızı ette yaşanan arz sorunlarını ortadan kaldırmak, artan talebi karşılamak ve piyasa fiyatlarını düşürmek amacıyla, uzun bir aradan sonra, 30 Nisan 2010 tarihinde gümrük vergilerinde yapılan düzenleme ile kasaplık hayvan ve kırmızı et ithalatına yeniden izin verilmiştir. Benzer bir durum 1982-1997 yılları arasında yaşanmış ve o dönem 342 milyon USD değerinde canlı hayvan (damızlık hariç) ve kırmızı et ithalatı yapılmıştır. Söz konusu dönemin sonunda (1996 yılında) ortaya çıkan "Deli Dana (BSE)" hastalığı nedeniyle 1997-2010 yılları arasında kasaplık hayvan ve et ithalatı yapılmamıştır (Cevger ve Sakarya, 2006; Aydın ve ark., 2010). Son yıllarda yeniden başlayan ithalat sürecinin kırmızı etteki arz açığını kapatmada ve iç piyasa fiyatlarını düşürmedeki etkinliği, besleme maliyetlerinin fiyatlar üzerindeki baskısı ve ilerleyen dönemde üretici fiyatlarının nasıl bir seyir izleyeceği tartışılmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de sığırın kırmızı et üretimindeki payı ve ithalattaki ağırlığı dikkate alınarak; canlı sığır ve sığır eti ithalatındaki gelişmeler değerlendirilmiş, cari ve sabit sığır eti ve besi yemi fiyatları trend analizi ile incelenmiştir.

## MATERYAL VE METOT

Araştırmanın materyalini, 2010-2016 yılları arasındaki canlı sığır ve sığır eti ithalatı, 1998-2017 yılları arasındaki cari sığır eti ve besi yemi fiyatları ve 1998 Ocak-2017 Eylül arasındaki aylık üretici fiyatları endeksi (ÜFE) oluşturmaktadır (ESK, 2015 ve 2016; TÜİK, 2017; YEM-BİR, 2017; UKON, 2017). Analizin yapıldığı tarihte 2017 yılı için sığır eti üretici fiyatları TÜİK tarafından henüz açıklanmadığı için, Ulusal Kırmızı Et Konseyi (UKON)'nin Ocak-Eylül 2017 arasında Türkiye'nin yedi bölgesindeki kombina ve kesimhanelerden (Et ve Süt Kurumu-ESK dahil) haftalık olarak elde ettiği "yağsız dana kesim" fiyatlarının ortalaması alınmıştır. Aynı şekilde besi yemi için 2017 yılı Ocak-Eylül arası ortalama fiyat hesaplanmıştır.

Besilik ve kasaplık sığır ile sığır eti ithalatı miktar ve değer açısından değerlendirilmiş, iç piyasadaki üretici fiyatları ile mukayese edilmiştir. İthalatın birim değerleri (USD/Kg) hesaplanmış, yıllık ortalama döviz kuru (BUMKO, 2017) kullanılarak söz konusu değerler Türk Lirası (TL)'na çevrilmiştir. Diğer taraftan cari sığır eti üretici fiyatları ve besi yemi fiyatları (1998-2017), aylık ÜFE kullanılarak sabit fiyatlara dönüştürülmüştür. Böylece 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatları baz alınarak cari fiyatlar üzerindeki enflasyon etkisi ortadan kaldırılmıştır. Daha sonra 1998-2017

arasındaki cari fiyatlar ve hesaplanan sabit fiyatlardaki gelişmeler trend analizi ile incelenmiş ve 2018-2020 arası dönem için yıllık fiyat tahminleri yapılmıştır.

Zaman serisi yöntemlerinden biri olan trend analizi, uzun dönemde serinin belirli bir yöne doğru gelişimini gösterir (Yüzer ve ark., 2006). Analizde öncelikle serinin düzensiz, mevsimlik ve devri hareketlerin etkisinden kurtarılarak uzun bir devrenin etkisi altındaki değerleri elde edilir. Daha sonra bu verilerle trendin şekli saptanarak onu temsil edebilecek fonksiyondaki parametrelerin bulunması amaçlanır. Böylece bulunan denklemler gelecek dönem için tahminler yapmak mümkün hale gelir (Akdeniz, 2004).

Yapılan analizlerde Minitab 17.1.0 programında bulunan doğrusal (linear), karesel (quadratic), üssel (exponential) ve s-eğrisi (s-curve) trend modelleri denenmiştir. Elde edilen sonuçların doğruluk ölçütleri olarak; ortalama mutlak yüzde hata (MAPE-mean absolute percentage error), ortalama mutlak sapma (MAD-mean absolute deviation) ve ortalama karesel sapma (MSD-mean squared deviation) kullanılmıştır. Bu modellerde MAPE,

MAD ve MSD doğruluk ölçütlerine göre değerleri en düşük hesaplanan matematiksel model tercih edilmiştir (Minitab, 2013).

## BULGULAR

Türkiye'de 2010-2016 yılları arasında gerçekleştirilen besilik ve kasaplık sığır ile sığır eti ithalatına ilişkin bilgiler Tablo 1 ve 2'de verilmiştir. İncelenen dönemde sığırın besi materyali olarak sürekli ithal edildiği, 2016 yılında en yüksek miktara ulaşıldığı görülmektedir. Doğrudan kesime sevk edilecek sığırın ithalatına ise 2015 yılı dışında devam edilmiştir. Sığır etinin ilk iki yıl (2010 ve 2011) dışında karkas olarak ithal edilmediği, genellikle kemikli et şeklinde tercih edildiği anlaşılmaktadır. Son üç yılda (2014-2016) ise kemiksiz etin de önemli miktarlarda ithal edildiği görülmektedir. Her iki tabloda tespit edilen en önemli bulgu ithal edilen canlı sığır ve sığır etinin birim (Kg) değerlerinin incelenen dönemde (2010-2016) USD cinsinden düşmesine rağmen, kurdaki değişimler neticesinde TL cinsinden artıyorsa olmasıdır.

**Tablo 1.** Türkiye'de besilik ve kasaplık sığır ithalatı (Miktar ve değer)

**Table 1.** Nutrition and slaughter cattle import in Turkey (Quantity and value)

Yıllar	Döviz Kuru (TL/1USD)	Besilik Sığır				Kasaplık Sığır			
		Adet (Baş)	Canlı Ağırlık (Ton)	USD/Kg	TL/Kg	Adet (Baş)	Canlı Ağırlık (Ton)	USD/Kg	TL/Kg
2010	1,498	1.443	363	5,12	7,68	118.578	54.123	3,81	5,71
2011	1,671	227.871	53.296	4,74	7,92	164.360	82.839	3,66	6,12
2012	1,792	228.421	48.189	5,24	9,39	194.448	107.321	3,34	5,99
2013	1,902	130.897	29.869	5,06	9,63	28.869	14.558	3,05	5,80
2014	2,187	23.604	5.775	5,67	12,41	792	368	4,96	10,85
2015	2,719	154.194	39.909	4,12	11,20	-	-	-	-
2016	3,019	407.888	105.537	3,68	11,11	22.292	10.806	2,77	8,35

**Tablo 2.** Türkiye'de sığır eti ithalatı (Miktar ve değer)

**Table 2.** Beef import in Turkey (Quantity and value)

Yıllar	Döviz Kuru (TL/1USD)	Karkas			Kemikli			Kemiksiz		
		Miktar (Ton)	USD/Kg	TL/Kg	Miktar (Ton)	USD/Kg	TL/Kg	Miktar (Ton)	USD/Kg	TL/Kg
2010	1,498	309	5,61	8,41	50.349	4,92	7,36	-	-	-
2011	1,671	552	5,36	8,95	110.179	4,62	7,72	-	-	-
2012	1,792	-	-	-	25.436	3,77	6,76	1	11,12	19,92
2013	1,902	-	-	-	6.141	3,95	7,52	-	-	-
2014	2,187	-	-	-	120	4,89	10,70	520	8,98	19,64
2015	2,719	-	-	-	11.206	4,69	12,76	6.368	8,22	22,34
2016	3,019	-	-	-	21	4,11	12,41	5.638	7,29	22,01

Cari sığır eti üretici fiyatları ve besi yemi fiyatları, ÜFE'ye göre hesaplanan dönüştürme katsayıları (deflatör) ve sabit fiyatlar Tablo 3'de görülmektedir. İncelenen dönemde hem sığır eti hem de yem fiyatlarında cari olarak yaklaşık 17 kat artış olduğu

belirlenmiştir. Cari fiyatlardaki enflasyon etkisi ortadan kaldırıldığında, hem besi yemi hem de sığır eti fiyatlarının 1998-2017 arasında reel olarak sırasıyla %20 ve %21 oranında düştüğü söylenebilir.

**Tablo 3.** Yıllara göre sığır eti ve besi yemi için cari ve sabit fiyatlar

**Table 3.** Current and fixed prices for beef meat and fattening feed according to years

Yıllar	Cari Fiyat (TL)		ÜFE Deflatör (3)	Sabit Fiyat (TL)*	
	Sığır Eti (1)	Besi Yemi (2)		Sığır Eti (4): 1x3	Besi Yemi (5): 2x3
1998	1,48	0,05	22,32	33,04	1,12
1999	2,13	0,08	14,68	31,28	1,17
2000	2,84	0,09	9,45	26,84	0,85
2001	3,33	0,13	6,12	20,39	0,80
2002	5,57	0,19	3,89	21,67	0,74
2003	8,42	0,24	3,05	25,72	0,73
2004	9,17	0,32	2,75	25,22	0,88
2005	9,56	0,30	2,52	24,13	0,76
2006	10,29	0,31	2,31	23,80	0,72
2007	11,16	0,40	2,16	24,16	0,87
2008	11,72	0,48	1,93	22,57	0,92
2009	13,41	0,43	1,90	25,44	0,82
2010	18,41	0,47	1,75	32,27	0,82
2011	18,54	0,58	1,58	29,36	0,92
2012	17,51	0,65	1,48	25,91	0,96
2013	15,83	0,71	1,42	22,50	1,01
2014	17,10	0,74	1,29	22,03	0,95
2015	21,14	0,75	1,22	25,86	0,92
2016	25,03	0,80	1,18	29,46	0,94
2017	26,13	0,90	1,00	26,13	0,90

\* 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatlarına göre

Cari fiyatlar için yapılan trend analizlerinde MAPE, MAD ve MSD değerleri en düşük karesel (quadratic) modelde hesaplanmıştır (Tablo 4). Buna göre, sığır etinde 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (26,13 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar yaklaşık %10 artış olacağı (28,70 TL/Kg) söylenebilir ( $Y=0,22+1,054t+0,008t^2$ ).

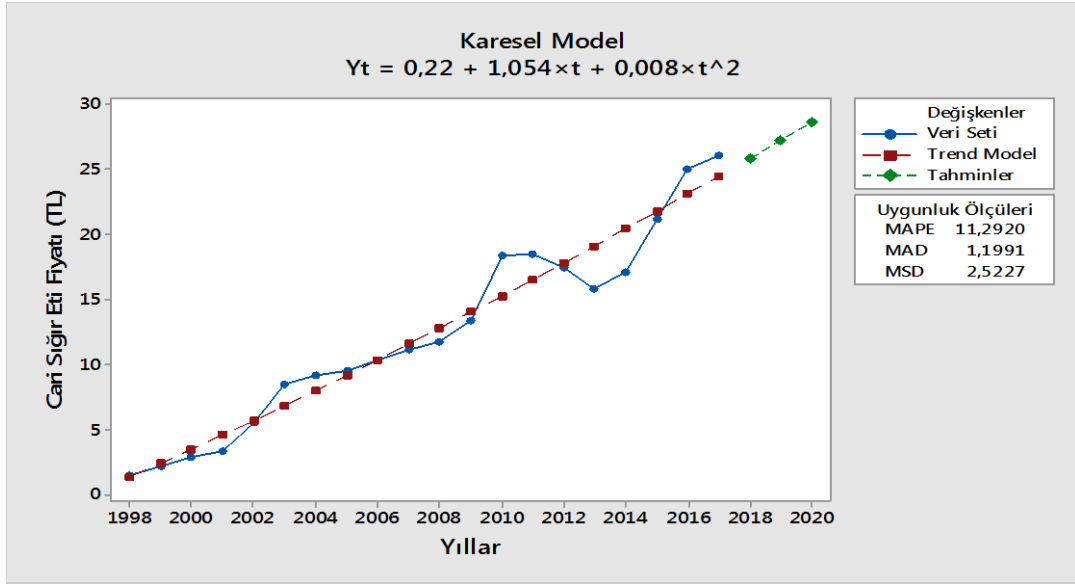
Besi yeminde ise, 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (0,90 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar yaklaşık %17 artış olacağı (1,05 TL/Kg) tahmin edilmektedir ( $Y=0,0097+0,033t+0,0006t^2$ ) (Grafik 1 ve 2).

**Tablo 4.** Trend modelleri için doğruluk ölçütü değerleri

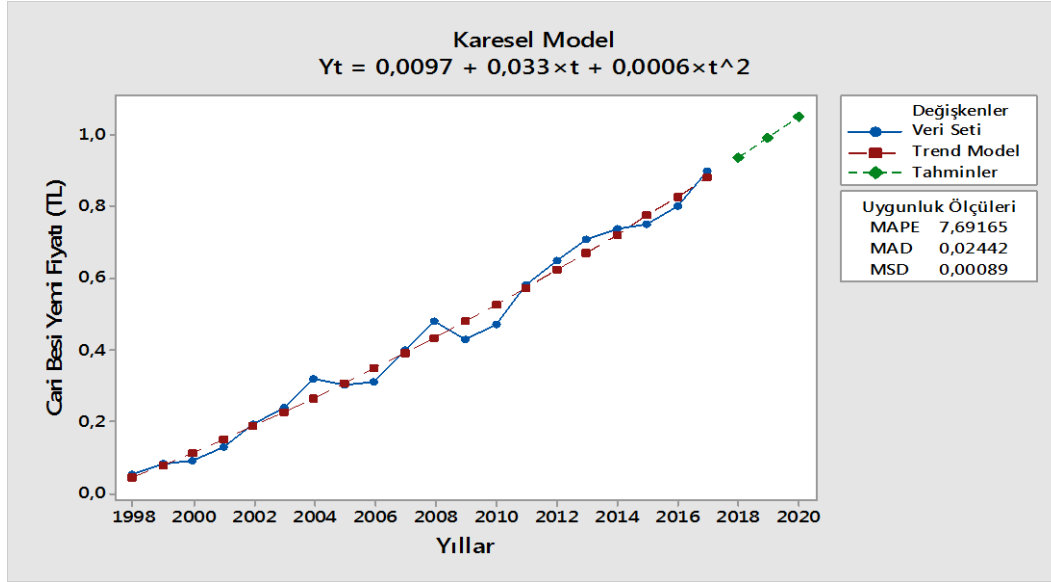
**Table 4.** Accuracy criteria values for trend models

Değişkenler	Doğruluk Ölçütleri	Doğrusal (Linear) Model	Karesel (Quadratic) Model	Üssel (Exponential) Model	S-eğrisi (S-curve) Model
Cari Sığır Eti Fiyatı (TL)	MAPE	12,2633	<b>11,2920</b>	26,8841	14,6537
	MAD	1,2424	<b>1,1991</b>	2,7913	1,5589
	MSD	2,5788	<b>2,5227</b>	11,4286	4,1475
Cari Besi Yemi Fiyatı (TL)	MAPE	11,5150	<b>7,6916</b>	21,5515	12,3296
	MAD	0,0271	<b>0,0244</b>	0,0760	0,0299
	MSD	0,0012	<b>0,0008</b>	0,0116	0,0013
Sabit Sığır Eti Fiyatı (TL)	MAPE	10,7001	<b>9,3238</b>	10,4398	Hata
	MAD	2,7706	<b>2,3994</b>	2,7294	Hata
	MSD	12,0618	<b>10,2679</b>	12,1207	Hata
Sabit Besi Yemi Fiyatı (TL)	MAPE	10,1340	<b>9,4712</b>	9,7291	9,4994
	MAD	0,0899	<b>0,0839</b>	0,0873	0,0911
	MSD	0,0138	<b>0,0093</b>	0,0139	0,0181





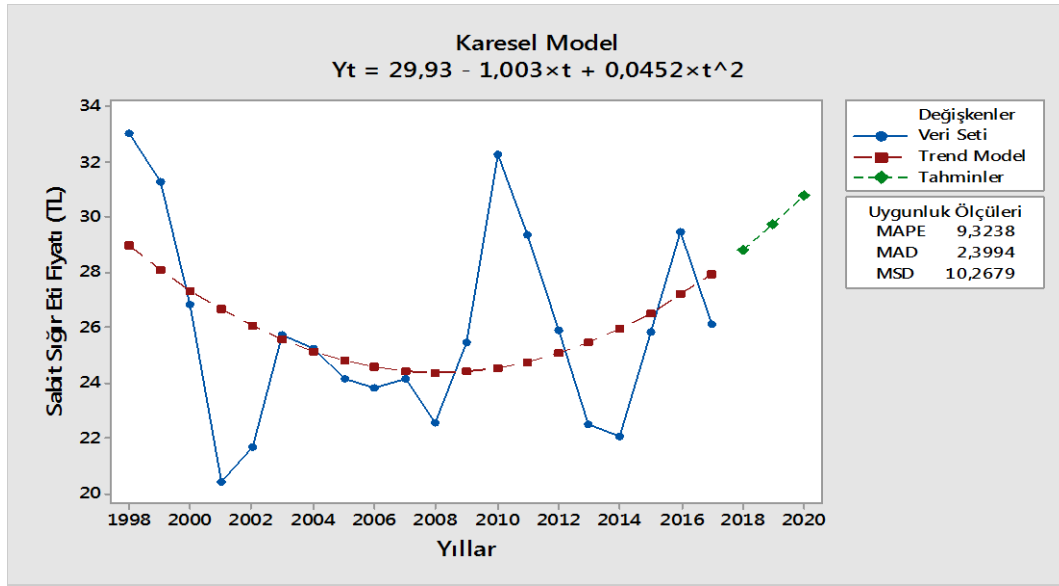
**Grafik 1.** Cari sığır eti üretici fiyatları için trend modeli ve tahmini fiyatlar  
**Graphic 1.** Trend model for current beef producer prices and the estimated prices



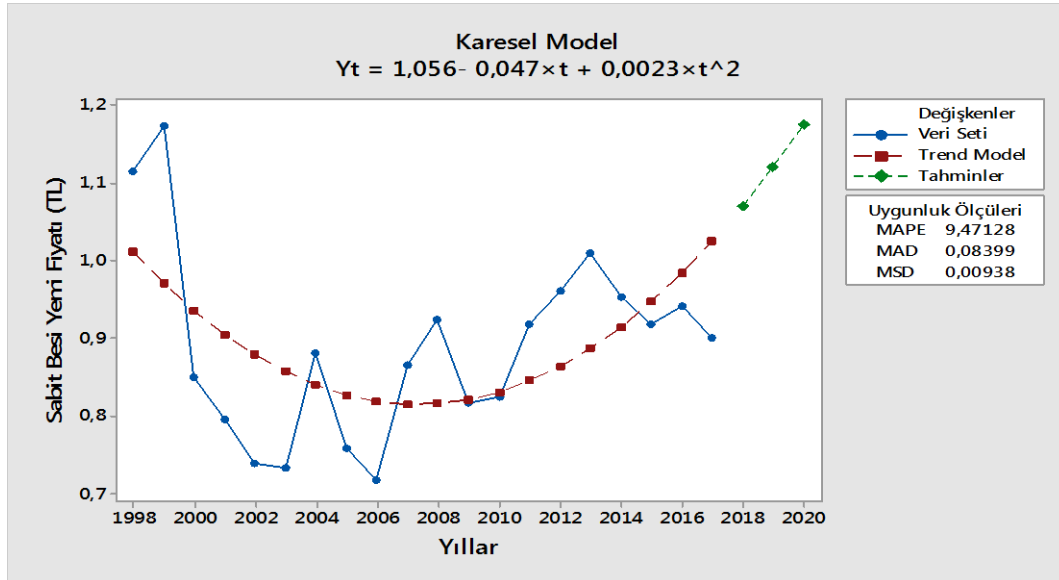
**Grafik 2.** Cari besi yemi fiyatları için trend modeli ve tahmini fiyatlar  
**Graphic 2.** Trend model for current fattening feed prices and the estimated prices

Sabit fiyatlar için yapılan trend analizi sonuçları da Grafik 3 ve 4'de görülebilir. Her iki fiyat düzeyi için MAPE, MAD ve MSD değerleri en düşük karesel (quadratic) modelde hesaplanmıştır (Tablo 4). Buna göre, sığır etinde 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (26,13 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar reel olarak yaklaşık %18 artış olacağı (30,78 TL/Kg) söylenebilir ( $Y=29,93-$

$1,003t+0,0452t^2$ ). Besi yeminde ise 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatı (0,90 TL/Kg) dikkate alındığında; 2020 yılı sonuna kadar reel olarak yaklaşık %31 artış olacağı (1,18 TL/Kg) tahmin edilmektedir ( $Y=1,056-0,047t+0,0023t^2$ ). Grafiklerde görülen tahmini fiyatlar yıllar itibariyle Tablo 5'de sunulmuştur.



**Grafik 3.** Sabit sığır eti üretici fiyatları için trend modeli ve tahmini fiyatlar  
**Graphic 3.** Trend model for fixed beef producer prices and the estimated prices



**Grafik 4.** Sabit besi yemi fiyatları için trend modeli ve tahmini fiyatlar  
**Graphic 4.** Trend model for fixed fattening feed prices and the estimated prices

**Tablo 5.** Trend modellerine göre tahmini fiyatlar (TL)  
**Table 5.** Estimated prices according to trend models (TL)

Yıllar	Cari Fiyat (TL)		Sabit Fiyat (TL)	
	Sığır Eti	Besi Yemi	Sığır Eti	Besi Yemi
2018	25,89	0,94	28,80	1,07
2019	27,29	0,99	29,75	1,12
2020	28,70	1,05	30,78	1,18

## TARTIŞMA

Canlı sığır ve sığır etinde Türkiye'yi tekrar ithalata sevk eden 1998-2009 arasındaki sürecin doğru analiz edilmesi gerekmektedir. Konuya öncelikle arz-talep dengesini etkileyen; sığır varlığı, et üretimi, karkas verimi, nüfus ve kişi başına gelir değişkenlerinden başlamak yerinde olacaktır. Sığır varlığının 1998-2003 arasında %11,27 azaldığı, 2003-2009 arasında ise %9,56 arttığı tespit edilmiştir. Bu gelişme 1998-2009 arasında sığır sayısının (yaklaşık 11 milyon baş) adeta yerinde saymasına neden olmuştur. Aynı dönemde sığır eti üretimi 1998'de 360 bin tondan 2003'de 290 bin tona gerilemiş, 2007'de 432 bin tona kadar yükselmesine rağmen, 2009'da 325 bin tonda kalmıştır. Söz konusu dönemde kesilen sığır sayısı yaklaşık %32 azalmış, üretilen et miktarı ise %9,5 düşmüştür. Bunun en önemli nedeni, 1998-2009 arasında ortalama karkas ağırlığının 163 kg'dan 217 kg'a yükselmesidir. Karkas ağırlığındaki artışı da sürü kompozisyonundaki kültür ve melez ırk oranının ifade edilen dönemde %58'den %76'ya yükselmesine bağlamak gerekir (TÜİK, 2017). Talep yönünden incelendiğinde ise, 1998-2009 arasında ülke nüfusunun yaklaşık %16 artarak 73 milyona ulaştığı bilinmektedir. Nüfus artışına ilave olarak alım gücünde ortaya çıkan iyileşme de talebe olumlu katkı sağlamıştır. Zira kişi başına gelir 1998-2009 arasında yaklaşık %102 artmış ve 9 bin USD'ye yükselmiştir (TÜİK, 2017). Diğer taraftan ülkeye gelen turist sayısının aynı dönemde yaklaşık %178 artarak 27 milyona ulaşmasının talep açısından önemli olduğunu vurgulamak gerekir (TÜRSAB, 2017). Sonuçta bu süreçte arz-talep dengesi talep lehine bozulmuş, sığır etinde üretici fiyatları 2010'da ciddi oranda yükselmiştir. Söz konusu artış, cari olarak %37 (Grafik 1), reel anlamda da %27 (Grafik 3) oranında gerçekleşmiştir. Bu gelişmeye bağlı olarak cari tüketici fiyatlarında da %39 artış meydana gelmiştir (Erdoğan ve Çiçek, 2017). Dünya'da ise 2000-2010 arasında toplam et fiyat endeksinin yaklaşık %30, sığır eti fiyat endeksinin yaklaşık %40 yükseldiğini de belirtmekte fayda vardır (SETBİR, 2013). Yeniden başlayan ithalat sürecinde Türkiye 2010-2016 arasında besilik ve kasaplık olarak toplam 1,7 milyon baş canlı sığır (toplam değeri: 2,2 milyar USD) ithal etmiştir. Bunun miktar olarak yaklaşık %69'u, değer olarak yaklaşık %57'si besilik sığıra aittir. Aynı dönemde yaklaşık 217 bin ton (toplam değeri: 1 milyar USD) sığır eti ithalatı yapılmış olup, %94'ü (değer olarak %90'ı) kemikli olarak tercih edilmiştir (ESK, 2015 ve 2016). Söz konusu dönemde ithalatın birim değerlerinin öncelikle döviz kuru baskısında olduğu net bir şekilde görülmektedir (Tablo 1 ve 2). Yaklaşık 2 kat artan USD kuru ithal edilen canlı sığır ve sığır etinin iç

piyasaya yansıyan fiyatlarını 2010-2016 arasında yükseltmiştir. Bu durum ithalatın maliyetini etkilediği gibi, ithalatın iç piyasadaki sığır eti fiyatlarını düşürmeye yönelik etkinliğini de zayıflatmaktadır. Nitekim 2010-2014 arasında sığır eti üretici fiyatlarında reel olarak yaklaşık %32'lik bir gerileme görülse de, 2015 ve 2016'da fiyatların yeniden yükselme trendine girdiği anlaşılmaktadır. Her ne kadar 2017 Ocak-Eylül arası ortalama fiyatlarında reel bir düşme olmasına rağmen, bu çalışmada yapılan trend analizi sonuçlarına göre, 2018-2020 arasında fiyatların tekrar yükseleceği tahmin edilmektedir (Grafik 3).

İthalata rağmen fiyatların 2014 sonrasında yeniden yükselme eğiliminde olması, 2010-2016 arasındaki sığır eti arz-talep dengesini etkileyen değişkenlere de bağlanabilir. Bu dönem için talep yönünde en önemli değişiklik nüfusun %8,3 artarak 80 milyona ulaşmış olmasıdır. Kişi başına milli gelirin 2010-2016 arasında %3 artarak 11000 USD seviyesine yaklaştığı bilinmektedir. Aynı şekilde ülkeye gelen turist sayısının 2010-2014 arasında yaklaşık %29 artarak 37 milyona ulaştığı, ancak 2016'da yaklaşık 25 milyona düştüğünü belirtmek gerekir. Arz yönünden incelendiğinde ise, 2010-2016 arasında sığır sayısının yaklaşık %24'lük artışla 14 milyon başa ulaştığı, sığır eti üretiminin de yaklaşık %71'lik artışla 1 milyon tonu aştığı görülmüştür. Et üretimindeki artış oranının hayvan sayısındaki artış oranından daha yüksek olması, sürü kompozisyonundaki kültür ve melez ırk oranının %78'den %88'e yükselmesine ve ortalama karkas ağırlığının da 238 kg'dan 272 kg'a ulaşmasına bağlanabilir (TÜİK, 2017).

Arzın talebi karşılamadaki olumlu gelişmelere ve ithalata rağmen, fiyatların yeniden yükselmesinde en önemli gerekçe üretim maliyetleridir. Yem bitkisi üretiminin ihtiyacı karşılamadaki yetersizliği, yemde kullanılan hammaddelerin (başta mısır ve soya olmak üzere) önemli bir kısmının ithal edilmesi ve meraya dayalı yetiştiriciliğin düşük seviyede kalması nedeniyle, Türkiye'de hayvan besleme maliyetleri diğer ülkelere göre oldukça yüksektir. Bu da hayvansal ürün fiyatlarında Türkiye'yi diğer ülkelere göre dezavantajlı duruma getirmektedir. Avrupa Birliği (AB), Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya ve Avustralya'da sığır karkas fiyatları 2016 yılı için 8,19-13,48 TL/Kg arasında bildirilmiştir (ESK, 2016). Aynı yıl Türkiye'deki sığır eti üretici fiyatı (25,03 TL/Kg) dikkate alındığında, durumun ne denli ciddi boyutlarda olduğu anlaşılacaktır.

Diğer taraftan küresel iklim değişikliğine bağlı olarak son yıllarda ortaya çıkan kuraklık sorunu yem ve gıda fiyatlarının artmasına neden olmuştur. Kuraklık nedeniyle 2007-2008 yıllarında meydana gelen krizde mısır ve soya fiyatları 30'dan fazla ülkede ciddi oranda yükselmiştir (SETBİR, 2013). Türkiye'de de söz konusu yıllarda yem fiyatlarının reel olarak arttığı görülmektedir (Grafik 4). Benzer

bir kuraklık probleminin 2012'de yeniden yaşanması sonucu mısır ve soyada en büyük ihracatçı olan ABD'de bu ürünlerin fiyatları %50'nin üzerinde artmıştır (SETBİR, 2013). Buna bağlı olarak dış piyasada mısır (346 USD/ton) ve soyanın (696 USD/ton) fiyatları 2012 ortalarında zirve yapmıştır (YEM-BİR, 2017). Bu dönemde Türkiye de kuraklıktan nasibini almış, yağış rejiminin düşmesiyle kaba yemde de azalma meydana geldiği için saman fiyatları dahi yükselmiştir (SETBİR, 2013). Söz konusu dönemde yem fiyatlarındaki reel artışın 2007-2008 krizini de geride bıraktığı söylenebilir (Grafik 4).

Yaşanan bu gelişmeler, Türkiye'de maliyetli bir yapıya sahip olan hayvan yetiştiriciliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Özellikle küçük ve orta ölçek grubundaki üreticiler bu dönemlerde kapasite düşürme ya da üretimden vazgeçme gibi kararlar alabilmektedir. Zira 2007 yılında yaşanan kuraklığın etkisiyle 2008 ve 2009'da yem fiyatlarının reel olarak artması sonucu hem sığır sayısında hem de üretilen et miktarındaki azalmayı buna bağlamak mümkündür (TÜİK, 2017). Benzer bir durum 2010-2013 arasında yaşanmış, yem fiyatlarındaki reel artışlara ilave olarak, ithalatın etkisiyle gerileyen sığır eti üretici fiyatları üretici kararlarında rol oynamıştır. Nitekim 2013-2015 arasında sığır sayısının %2,9 azalması yanında 2013 ve 2014'de ortalama karkas veriminin de düşmesi, üretimden vazgeçme ve erken kesim gibi üretici davranışlarını akla getirmektedir (TÜİK, 2017).

Canlı sığırda ithalatın önemli oranda (%69) besilik materyalden yana kullanılmasının yukarıda ifade edilen besleme maliyetleri dikkate alındığında, et fiyatlarının düşürülmesinde etkin bir araç olamayacağı söylenebilir. Türkiye'de yapılan bir çalışmada, kültür ve melez ırk sığırlarla yürütülen sığır besiciliği faaliyetinde 2011-2012 üretim dönemi için canlı ağırlık maliyeti 7,76 - 9,70 TL/Kg arasında bildirilmiştir (Çelik ve Sarıözkan, 2017). Tablo 1'de görülen aynı yıllardaki besilik sığır ithalat birim değerlerine (7,92-9,39 TL/Kg) besi faaliyetinden kaynaklanan canlı ağırlık maliyetleri ilave edildiğinde, 2011-2012 arasındaki sığır eti cari üretici fiyatlarına ulaşıldığı görülmektedir. Bununla birlikte kasaplık sığır ithalatında kesim ve parçalama maliyetlerini, karkas ve kemikli et ithalatında ise parçalama maliyetlerini ithalatın birim değerlerine ilave etmek gerekir. Konuyla ilgili yapılan bir araştırmada, Türkiye'de 2015 yılı için sadece sığır karkas parçalama maliyeti 0,97 TL/Kg hesaplanmıştır (Cicek ve ark. 2016).

## SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye'de geçmiş yıllarda (1982-1997 arası) yapılan canlı hayvan ve et ithalatının ardından yeniden başlayan sürecin hayvancılık sektörüne ve piyasalara olan etkilerinin daha iyi

değerlendirilebilmesi amacıyla, özellikle son 20 yıllık dönem (1998-2017) incelenmiştir. Hayvancılık sektörünün toplam tarımsal desteklerden aldığı payın 2000-2013 arasında %0,5'den %31 seviyesine ulaşmış olması, hayvansal üretim ve verimlilik açısından olumlu bir gelişmedir (TEPGE, 2016). Buna rağmen, kırmızı ette mevcut üretimin talebi karşılayamaması ve ortaya çıkan fiyat artışları gerekçesiyle yeniden ithalat sürecine girilmiştir.

Kırmızı ette sığira olan bağımlılığın yıllar içerisinde arttığı ve bu durumun ithalata da yansıdığı görülmektedir. Nitekim 1998 yılında üretimde %68 olan sığırın payı 2010'da %79'a, 2016'da %90 düzeyine ulaşmıştır (TÜİK, 2017). Ayrıca 2010'dan itibaren değişen miktarlarda canlı küçükbaş (damızlık olmayan) ithalatı da yapılmasına rağmen, canlı sığırdaki ithalat değeri küçükbaşta göre 10 kat fazladır ve sadece sığır eti ithalatı gerçekleştirilmiştir (ESK, 2015 ve 2016). Talepteki (nüfus, kişi başına gelir ve turizm) pozitif yönlü gelişmelerin önümüzdeki dönemde devam etmesi durumunda, sığır etine olan talebin daha da artacağı beklenebilir. Türkiye'de hayvan besleme maliyetlerinin yüksekliği ve küresel iklim değişikliğinin yem fiyatları üzerindeki etkisi dikkate alınarak, sığır eti üretici fiyatları besi yemi fiyatları ile birlikte incelenmiştir. Trend analizi sonuçlarına göre, her iki fiyat düzeyinin (cari ve sabit) de önümüzdeki dönemde (2018-2020) yükseleceği tahmin edilmiştir. Canlı sığır ve sığır eti ithalatının iç piyasadaki fiyatları kısmen etkilediği, yıllar içerisinde döviz kurundaki değişimin ithalatın maliyetine yansıdığı ve yem fiyatlarındaki artışın sığır eti üretici fiyatları üzerinde daha fazla baskı oluşturduğu belirlenmiştir. Dolayısıyla ithalatın et fiyatlarının düşürülmesinde etkin ve kalıcı bir rol oynamadığı, aksine besleme maliyetleri ile birlikte üretici kararlarında olumsuz bir etkiye sahip olduğu söylenebilir. Dünya'da artan yem maliyetlerinin sığır eti üretimindeki büyümeyi yavaşlatacağı ve et fiyatları üzerinde baskı oluşturacağı tahmin edildiğine göre (FAO, 2016), ithalatın uzun dönemde çözüm üretemeyeceği ortadadır.

Sığır eti arzında hayvan materyalinin verim yönü ve işletme ölçeğinin önemli olduğunu vurgulamak gerekir. Türkiye'de sığır etinin büyük oranda süt verim yönlü kültür ve melezi ırklar (Holştayn, Montofon ve Simental) ile yerli ırklardan (Doğu ve Güney Anadolu Kırmızısı, Zavot ve Boz ırk) sağlandığı görülür. ABD ve AB'de ise et verimi yüksek ırkların (Angus, Limuzin, Şarole, Hereford veya melezleri) tercih edildiği bilinmektedir (Gümüş ve Çınar, 2016). Ülkemizde yıllar içerisinde sığır karkas verimi yükselmiş olsa da, üretimde et verimi yüksek ırkların kullanılması arz artışı için önemli görülmektedir. Diğer taraftan, Türkiye'de 2013 yılı itibarıyla yaklaşık 375 bin sığır besi işletmesinin %76'sında 10 baş ve altında hayvan bulunduğu tespit edilmiştir. Sadece 1000 işletme 200 baş ve

üzerinde hayvana sahiptir. ABD'de işletme ortalaması 100 baş ve altı, AB'de ise 72 baştır (Gümüş ve Çınar, 2016). Bu durumda ülkemizde besi işletmelerinin ölçek ekonomisinin avantajlarından yeterince faydalanamadığını söylemek mümkündür.

Sığırın kırmızı et üretimindeki payının yıllar içerisinde artmasında, elbette toplumun tüketim alışkanlıklarının da ciddi payı bulunmaktadır. Ülkemizin belirli bölgelerinde koyun ve keçi etinin öncelikle tercih edildiğine yönelik çalışmalar mevcut olmakla birlikte (Cengiz ve ark. 2015, Karakuş ve ark. 2008), genellikle sığır eti tercihi ön plandadır. Kırmızı et arzı için küçükbaş hayvan yetiştiriciliğine 1998-2009 arasında yeterince önem verilmediğini de belirtmek gerekir. Söz konusu dönemde koyun varlığında yaklaşık %26, keçi varlığında %36 azalma meydana gelmiştir (TÜİK, 2017). Sonraki süreçte (2009-2016) hayvan sayısı önemli oranda yükselmesine rağmen, kırmızı et açığını kapatmada yetersiz kalmıştır. Önümüzdeki dönemde tüketici tercihlerini küçükbaş etine yönlendirici politikalar izleyerek, kırmızı et arzında küçükbaş hayvan oranının artırılması, ithalatın kısa vadede azalmasında, uzun vadede ortadan kalkmasında ciddi katkı sağlayacaktır.

Analizde kullanılan veri setinin sayısına bağlı olarak, sığır eti üretici fiyatları ve besi yemi fiyatları için yapılan öngörüler özellikle üç yıl ile sınırlı tutulmuştur. Çünkü zaman serilerinde veri setinin uzunluğunun geleceğe yönelik projeksiyonlar için analizin tahmin gücünü artırdığı bilinmektedir. Türkiye'de hayvan sayılarının ileriye yönelik projeksiyonu kapsamında yapılan bir modelleme çalışmasında vurgulandığı gibi (Cenan ve Gürcan, 2011); hayvancılık sektöründe geleceğe yönelik rasyonel politikaların gerçekleştirilebilmesi amacıyla, sağlıklı bir veri tabanına ve benzeri modelleme çalışmalarına daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Akdeniz F.** Olasılık ve İstatistik. Nobel Kitapevleri, 11.Baskı, Adana. 2004.
- Aydın E, Can MF, Aral Y, Cevger Y, Sakarya E.** Türkiye'de canlı hayvan ve kırmızı et ithalatı kararlarının sığır besicileri üzerine etkileri. Vet Hekim Der Derg. 2010; 81(2): 51-57.
- BESD-BİR.** Beyaz Et Sanayicileri ve Damızlıkçılar Birliği Derneği. Türkiye kanatlı eti üretimi 1990-2016. [http://www.besd-bir.org/assets/documents/Tyrkiye\\_kanatli\\_eti\\_yretimi.pdf](http://www.besd-bir.org/assets/documents/Tyrkiye_kanatli_eti_yretimi.pdf). Erişim Tarihi: 14.09.2017.
- BUMKO.** Bütçe ve Mali Kontrol Genel Müdürlüğü. Ortalama döviz kurları. <http://www.bumko.gov.tr/TR,150/doviz-kurlari.html>. Erişim Tarihi: 26.09.2017.
- Cenan N, Gürcan İS.** Türkiye çiftlik hayvan sayılarının ileriye yönelik projeksiyonu: ARIMA Modellemesi. Vet Hekim Der Derg. 2011; 82(1): 35-42.
- Cengiz F, Karaca S, Kor A, Ertuğrul M, Arık İZ, Gökdal Ö.** Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde değişimler ve yeni arayışlar, Türkiye Ziraat Mühendisliği VIII. Teknik Kongresi, Bildiriler Kitabı-2, 12-16 Ocak 2015, s. 809-837.
- Cevger Y, Sakarya E (2006):** Meat prices and factors affecting them in Turkey. Turk J Vet Anim Sci. 2006; 30: 1-6.
- Cicek H, Tandogan M, Kara R.** Cutting costs and retail cuts incomes in Holstein Bull carcasses. The 17th Asian-Australasian Association of Animal Production Societies Animal Science Congress, 22-25 August 2016, Fukuoka, Japan.
- Çelik C, Sarıözkan S.** Kırşehir İli Merkez İlçede sığır besiciliği yapan işletmelerin ekonomik analizi. Harran Üniv Vet Fak Derg. 2017; 6(1): 38-45.
- Erdoğan H, Çiçek H.** Modelling beef consumption in Turkey: the ARDL/bounds test approach. Turk J Vet Anim Sci. 2017; 41: 255-264.
- ESK 2015.** Et ve Süt Kurumu. 2015 yılı sektör değerlendirme raporu. [http://www.esk.gov.tr/upload/Node/10255/files/2015\\_Yili\\_Sektor\\_Raporu\\_Son.pdf](http://www.esk.gov.tr/upload/Node/10255/files/2015_Yili_Sektor_Raporu_Son.pdf). Erişim Tarihi: 15.12.2016.
- ESK 2016.** Et ve Süt Kurumu. 2016 yılı sektör değerlendirme raporu. [http://www.esk.gov.tr/upload/Node/10255/files/2016\\_Yili\\_Sektor\\_Degerlendirme\\_Raporu.pdf](http://www.esk.gov.tr/upload/Node/10255/files/2016_Yili_Sektor_Degerlendirme_Raporu.pdf). Erişim Tarihi: 11.08.2017.
- FAO 2016.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. OECD-FAO agricultural outlook 2016-2025. <http://www.fao.org/3/a-BO100e.pdf>, Erişim Tarihi: 20.10.2017.
- FAO 2017.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Statistics of producer prices. <http://www.fao.org/faostat/en/#data>, Erişim Tarihi: 08.10.2017.
- GTHB.** Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı. Hayvancılık Genel Müdürlüğü. Kırmızı et stratejisi. Ankara. 2015.
- Gümüş E, Çınar H.** Türkiye, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa Birliği sığır eti sektörlerinin karşılaştırılması ve dış ticaret açısından değerlendirilmesi. Harran Üniv Vet Fak Derg. 2016; 5(2): 177-183.
- Karakuş K, Aygün T, Alarşlan E.** Gaziantep İli Merkez İlçede kırmızı et tüketim alışkanlıkları. YYÜ Tar Bil Derg. 2008; 18 (2): 113-120.

- Minitab.** Minitab® 17.1.0, 2013 Minitab Inc., StatGuide, Time Series, Trend Analysis.
- SETBİR.** Türkiye Süt, Et, Gıda Sanayicileri ve Üreticileri Birliği. Dünya'da ve Türkiye'de yem, et ve süt sektörlerinde mevcut durum ve öngörüler raporu. Ankara. 2013.
- TEPGE.** Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü. Kırmızı et, durum ve tahmin. Yayın no: 279. 2016. <http://www.tepge.gov.tr/Dosyalar/Yayinlar/18b65e6405d044bca05ee68ddcd43d9b.pdf>. Erişim Tarihi: 04.10.2017.
- TÜİK.** Türkiye İstatistik Kurumu, Veri tabanı. <http://www.tuik.gov.tr/PreTabloArama.do?metod=search&araType=vt>, Erişim Tarihi: 15.09.2017.
- TÜRSAB.** Türkiye Seyahat Acentaları Birliği. Turizm verileri. <https://www.tursab.org.tr/tr/turizm-verileri>, Erişim Tarihi: 12.10.2017.
- UKON.** Ulusal Kırmızı Et Konseyi. <http://www.ukon.org.tr/Fiyatlar.aspx>, Erişim Tarihi: 28.09.2017.
- YEM-BİR.** Türkiye Yem Sanayicileri Birliği. <http://www.yem.org.tr/>, Erişim Tarihi: 28.09.2017.
- Yüzer AF, Ağaoğlu E, Tatlıdil H, Özmen A, Sıklar E.** İstatistik. Anadolu Üniversitesi Yayın No: 1448, Açıköğretim Fakültesi Yayın No: 771, Eskişehir. 2006.

## First Report of *Escherichia coli* O157 From Traditional Turkish Dairy Product Kaymak<sup>#</sup>

Didem SAĞLAM<sup>1</sup>, Esra ŞEKER<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*Mahfiruz Hatice Sultan Dormitory for Female Students, Republic of Turkey Higher Education Credit and Hostels Institution, Afyonkarahisar, Turkey*

<sup>2</sup>*Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Turkey*

<sup>#</sup>This study was supported by the Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Grand number 15.SAĞ.BİL.10) and was summarized from the master thesis of first author.

\*Corresponding author e-mail: esraseker@hotmail.com

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate the *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotype from traditional Turkish dairy product kaymak sold in Afyonkarahisar, investigate the *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* and *eaeA* genes in isolated strains by PCR and determine the antibiotic resistance of strains to some antibiotics commonly used in Turkey. For this purpose, a total of 100 kaymak samples sold in public bazaars located center town and villages of Afyonkarahisar were collected. *E. coli* O157 was isolated from 3 of 100 samples by using conventional culture methods and serological confirmation tests. The presence of *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* and *eaeA* genes in the isolated 3 strains was investigated by PCR. While all of 3 strains harboured the *Stx1* and *ehlyA* genes, the *Stx2* and *eaeA* genes were not found in the strains. The antibiotic resistance of strains was investigated by Kirby-Bauer disc diffusion test. While all of strains were resistant to cephalosporin, cefoxitin and ceftiofur, the resistance was also determined in the strains to ampicillin (66.7%), cephalothin (66.7%), ceftriaxone (33.3%), nalidixic acid (33.3%) and trimethoprim/sulphamethoxazole (33.3%). The present study is the first investigation showing the presence of *E. coli* O157 and its virulence genes in the kaymak in Turkey.

**Key words:** *E. coli* O157:H7, enterohemolysin, intimin, kaymak (clotted cream), Shiga toxin

### Geleneksel Türk Süt Ürünü Kaymaktan *Escherichia coli* O157'nin İlk Bildirimi

### ÖZ

Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da satılan geleneksel bir Türk süt ürünü olan kaymaktan *E. coli* O157:H7/H<sup>-</sup> serotipinin izolasyonu, izole edilen suşlarda *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* genlerinin PZR ile araştırılması ve suşların Türkiye'de yaygın olarak kullanılan bazı antibiyotiklere karşı antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla, Afyonkarahisar'ın merkez ve köylerindeki halk pazarlarında satılan toplam 100 kaymak örneği toplandı. Konvansiyonel kültür yöntemleri ve serolojik doğrulama testleri kullanılarak 100 kaymak örneğinin 3'ünden *E. coli* O157 izole edildi. İzole edilen 3 suşta *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* ve *eaeA* genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. Üç suşun tamamı *Stx1* ve *ehlyA* genlerine sahipken, suşlarda *Stx2* ve *eaeA* genleri bulunmadı. Suşların antibiyotik dirençliliği Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak araştırıldı. Suşların tamamı sefazolin, sefoksitin ve seftiofura dirençli iken, suşlarda ayrıca ampisilin (%66,7), sefalothin (%66,7), seftriakson (%33,3), nalidiksik asit (%33,3) ve trimetoprim/sulfametoksazole (%33,3) karşı da direnç tespit edildi. Sunulan çalışma, Türkiye'de kaymaklarda *E. coli* O157'nin ve serotipin virulens genlerinin varlığını gösteren ilk araştırmadır.

**Anahtar kelimeler:** *E. coli* O157:H7, enterohemolizin, intimin, kaymak, Şişa toksin

## INTRODUCTION

*Escherichia coli* O157:H7/H is a significant pathogen associated with hemorrhagic colitis (HC), hemolytic uremic syndrome (HUS) and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) in human. This serotype has been known to be one of the most important pathogens of food-borne infections worldwide, posing a great challenge to public health (Karmali 2010, Ko et al. 2016). The primer reservoirs of this bacterial agent are domestic ruminants and the consumption of food products of ruminant origin is associated with serious epidemic outbreaks (Chapman et al. 1993, Upton and Coia 1994, Kiranmayi et al. 2010).

The primer virulence factors of this serotype contributing to the infection pathogenesis are the Shiga toxins, intimin and the plasmid-encoded enterohemolysin (Karmali 2010, Bergan et al. 2012, Ko et al. 2016). Although antimicrobial agents are commonly used for the treatment of several bacterial infections, their usage for treating *E. coli* O157:H7/H infections are controversial among the researchers (Ikeda et al. 1999, Wong et al. 2000).

According to Turkish Food Codex Communiqué on Cream and Turkish Cream, kaymak is described to be cream containing at least 60% milk fat, while Afyon kaymak is defined as a product obtained from the boiling of buffalo milk according to the technique and keeping at least 2 minutes at 92 °C, and cooling according to the technique (TGK 2003). This traditional Turkish product has an important marketplace in terms of both the manufacture region and the country. Generally, pure Anatolian buffalo milk is preferred for the production of kaymak because of its high fat content, white color, rich aroma and flavor. If the buffalo milk is insufficient, the cow milk enriched by adding to certain amount of cream can also be used. However, recently, the most of kaymak sold on market and bazaars is originated from cow milk and/or cow and buffalo milk (mix). In the production of traditional kaymak pre-heating is firstly applied to the evening milk. For this purpose, the evening milk is slowly heated at 95 °C for 30 min, cooled and then left at room temperature overnight. The next morning the edge of container is perforated by using a pin, the releasing of milk cream layer is provided and morning milk is added from this perforation. The mixture of milk is slowly heated at 95 °C for 45 min again and allowed to cool at room temperature. After this period, it is refrigerated until morning and the kaymak layer is separated by cutting the next day (Siriken and Erol 2009, Şenel 2010).

Afyonkarahisar province is the famous city of Turkey in terms of traditional dairy products,

especially kaymak, produced by buffalo milk. Generally, the researches on Afyon kaymak or kaymak have focused on the microbiological and chemical quality of its (Siriken and Erol 2009, Şenel 2010), but in these studies, the presence of specific bacteria and limited chemical parameters has been investigated. However, sufficient data have not been described concerning the isolation and detection of virulence genes of *E. coli* O157:H7/H serotype from kaymak samples in Turkey. Therefore, the aim of this study was to investigate the presence of this serotype and its major virulence genes in kaymak and determine the antibiotic resistance of isolated strains to some antibiotics commonly used in Turkey.

## MATERIALS and METHODS

### *Kaymak samples*

The present study was carried out on homemade and commercial kaymak samples sold in public bazaars located in center town and villages of Afyonkarahisar province of Western Turkey. For this purpose, a total of 100 kaymak samples (n= 69 homemade, n= 31 commercial) were bought from several bazaars between February and April 2016. Samples were immediately transported to microbiology laboratory in a cool box on ice. Of 100 samples, 57, 32 and 11 were originated from cow milk, cow and buffalo milk (mix) and buffalo milk, respectively.

### *Isolation and identification of E. coli O157:H7/H from kaymak samples*

Each kaymak sample was aseptically homogenized by mixing in its own plastic container. Ten grams samples were transferred into 90 mL modified Tryptone Soy Broth (mTSB, Oxoid Ltd., UK) containing Novobiocin (20 mg/L) (Oxoid Ltd., UK) and homogenized by vortexing at 120 rpm for 5 min. The mixture was aerobically incubated at 37 °C for 24 hours. A 10 µL aliquot was taken from mTSB and inoculated onto Cefixime-Tellurite added Sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC, Oxoid Ltd., UK). The plates were incubated at 37 °C under aerobic conditions for 24 hours. The colourless colonies growing on CT-SMAC agar were evaluated to be suspect and the identification of these colonies was made using Gram staining, oxidase, indole, methyl red, Voges Prouskauer, urease, hydrogen sulphide, citrate, glucose, sucrose, lactose, cellobiose and motility tests. For serological confirmation, *E. coli* O157 latex test kit (Oxoid Ltd., UK) and H7 antisera (Denka Seiken Co. Ltd., Japan) were used (Şeker and Yardımcı 2008). In all applications, EHEC O157:H7 strain EDL 933 and *E. coli* ATCC 25922 were used as the positive and negative control strains, respectively.



#### Detection of *Stx1*, *Stx2*, *ehlyA* and *eaeA* genes in *E. coli* O157:H7/H strains by PCR

DNAs were extracted from the positive control, negative control and all test strains using boiling method. For this purpose, control and test strains were inoculated onto Trypticase Soy Agar (Oxoid Ltd., UK). After the incubation, one colony was suspended in 500  $\mu$ L of DNase-RNase free DEPC-treated water and the suspension was subjected to boiling at 100 °C in a water bath for 10 minutes. Afterwards the suspension was centrifuged at 9,167 *g* for 5 minutes and the supernatant containing bacterial DNA was stored at -20 °C for PCR mixture.

The primers designed by Ottawa et al. (2004) and Osek (2003) were preferred for the detection of *Stx1*, *Stx2* genes and *ehlyA*, *eaeA* genes, respectively (Table 1). Singleplex PCR was used for the detection of *eaeA* gene, while multiplex PCR (mPCR) was performed for the detection of *Stx1*, *Stx2* and *ehlyA* genes. PCR mixture used in the present study was as follows: two  $\mu$ L of the extracted DNA were added to 50  $\mu$ L of PCR mixture of 10X PCR buffer, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L of each dNTP, 2 U Taq polymerase, 0.25  $\mu$ mol/L of each primer and deionized water. The mPCR amplification conditions of *Stx1*, *Stx2* and *ehlyA* genes consisted of an initial denaturation step at 95 °C for 4 min, and 30 cycles of 95 °C for 30 s, 57 °C for 30 s, 72 °C for 30 s and a final step at 72 °C for 7 min. The amplification cycles of *eaeA* gene were programmed as 4 min at 95 °C for initial denaturation; 30 cycles, 30 s at 95 °C, 1 min at 45 °C, 1 min at 72 °C; and 7 min final extension step at 72 °C (Şeker et al. 2010). All PCR products were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel and visualized using ethidium bromide on UV transilluminator. Product sizes were determined by comparison with 100-bp molecular marker (DNA ladder; Fermentas, Vilnius, Lithuania).

#### Antibiotic susceptibility test

The antimicrobial resistance of positive and negative control strains and test strains was determined by using Kirby-Bauer disc diffusion method on Mueller Hinton agar (Oxoid Ltd., UK) according to the guidelines of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2013). For this purpose, amoxicillin+clavulanic acid (30 $\mu$ g), ampicillin (10 $\mu$ g), cephalothin (30 $\mu$ g), cephalozin (30 $\mu$ g), cefoxitin (30 $\mu$ g), ceftiofur (30 $\mu$ g), ceftriaxone (30 $\mu$ g), enrofloxacin (5 $\mu$ g), gentamicin (10 $\mu$ g), kanamycin (30 $\mu$ g), streptomycin (10 $\mu$ g), ciprofloxacin (5 $\mu$ g), nalidixic acid (30 $\mu$ g), tetracycline (30 $\mu$ g), imipenem (10 $\mu$ g) and

trimethoprim+sulfamethoxazole (25 $\mu$ g) antibiotic discs (Oxoid Ltd., UK) were used. The plates were aerobically incubated for at 37 °C 24 hours.

## RESULTS

#### Isolation and identification findings

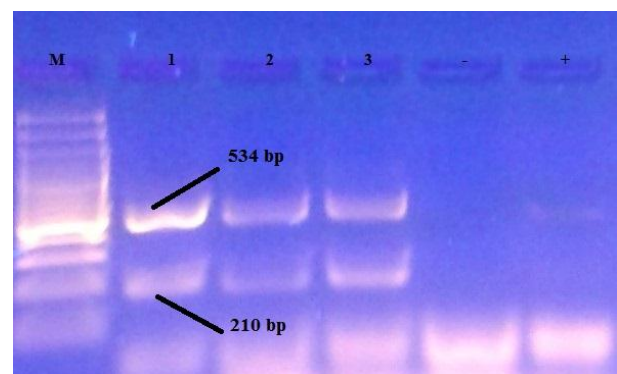
According to standard biochemical and serological test results, *E. coli* O157 was identified from 3 of 100 kaymak samples. H7 antigen was not determined in the strains. Of isolated strains 1 was homemade and originated from cow milk, while 2 strains were commercial and originated from cow and buffalo milk (mix).

#### Distribution of virulence genes

All of 3 strains isolated from kaymak samples harboured the *Stx1* and *ehlyA* genes, while the *Stx2* and *eaeA* genes were not found in the strains. Amplification of *Stx1* (210 bp) and *ehlyA* (534 bp) genes in 3 *E. coli* O157 strains was shown in Figure 1.

#### Antibiotic susceptibility test

According to Kirby-Bauer disc diffusion test results, all of 3 *E. coli* O157 strains were resistant to cephalozin, cefoxitin and ceftiofur, while they are sensitive to enrofloxacin, gentamicin, ciprofloxacin, tetracycline and imipenem. The resistance to ampicillin (66.7%), cephalothin (66.7%), ceftriaxone (33.3%), nalidixic acid (33.3%) and trimethoprim+sulfamethoxazole (33.3%) was also found in the strains. Antibiotic resistance of strains was shown in Table 2.



**Figure 1:** *Stx1* and *ehlyA* mPCR findings in *E. coli* O157 strains. M: 100 bp DNA ladder; lane 1-3: *Stx1* (210 bp) and *ehlyA* (534 bp) genes positive test strains; -: negative control (*E. coli* ATCC 25922); +: positive control (*E. coli* O157:H7 EDL931).

**Table 1:** Oligonucleotide primers used in this study

Gene		Oligonucleotide sequence (5'-3')	Product size (bp)
<i>Stx1</i>	Forward	TGTAAGCTGGAAAGGTGGAGTATACA	210
	Reverse	GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	
<i>Stx2</i>	Forward	GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC	484
	Reverse	GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	
<i>ehlyA</i>	Forward	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534
	Reverse	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	
<i>eaeA</i>	Forward	GGGATCGATTACCGTCAT	837
	Reverse	TTTATCAGCCTTAATCTC	

**Table 2:** Antibiotic resistance of *E. coli* O157 strains

Antibiotic	<i>E. coli</i> O157 strains (n=3)					
	S		I		R	
	n	%	n	%	n	%
Amoxicillin+clavulanic acid (30µg)	2	66.7	1	33.3	-	0
Ampicillin (10µg)	1	33.3	-	0	2	66.7
Cephalothin (30µg)	-	0	1	33.3	2	66.7
Cephazolin (30µg)	-	0	-	0	3	100
Cefoxitin (30µg)	-	0	-	0	3	100
Ceftiofur (30µg)	-	0	-	0	3	100
Ceftriaxone (30µg)	2	66.7	-	0	1	33.3
Enrofloxacin (5µg)	3	100	-	0	-	0
Gentamicin (10µg)	3	100	-	0	-	0
Kanamycin (30µg)	2	66.7	1	33.3	-	0
Streptomycin (10µg)	1	33.3	2	66.7	-	0
Ciprofloxacin (5µg)	3	100	-	0	-	0
Nalidixic acid (30µg)	2	66.7	-	0	1	33.3
Tetracycline (30µg)	3	100	-	0	-	0
Imipenem (10µg)	3	100	-	0	-	0
Trimethoprim+sulfamethoxazole (25µg)	2	66.7	-	0	1	33.3

S: Sensitive; I: Intermediate; R: Resistant

## DISCUSSION

The present study investigated the presence of *E. coli* O157:H7/H- serotype and its major virulence genes in the kaymak, a traditional Turkish dairy product, and the antibiotic resistance of isolated

strains to some antibiotics commonly used in Turkey.

Several researchers have shown the presence of *E. coli* O157:H7/H- in various raw or treated milk and other dairy products of animal origin and emphasized the importance of this serotype in

terms of public health (Şeker and Yardımcı 2008, Rantsiou et al. 2012, Sancak et al. 2015, Tanzifi et al. 2015, Douëllou et al. 2016). Although kaymak is a sought-after Turkish dairy product, only one study investigating the presence of *E. coli* O157 in kaymak has been found in Turkey. İpekcioglu (2009) reported that *E. coli* O157:H7/H- was detected in none of the examined 100 kaymak samples. In our study, 100 kaymak sold in public bazaars located center town and villages of Afyonkarahisar were examined for the presence of *E. coli* O157:H7/H-. Of the 100 examined samples, 3 were positive for *E. coli* O157. This is the first report of *E. coli* O157 from kaymak in Turkey. Epidemiological data obtained from food-borne outbreaks or individual cases indicate that the contamination of milk and other dairy products by *E. coli* O157:H7/H- may be associated with the external contamination of teats and mastitis, poor milking hygiene, insufficient pasteurization and/or post processing contamination (Şeker and Yardımcı 2008, Farrokh et al. 2013, Sancak et al. 2015; Nobili et al. 2016). In the studies related to the development of this serotype in different environments have been emphasized that *E. coli* O157:H7/H- is more sensitive than *Salmonella* spp. to high temperature values (Berry and Cutter 2000). Heating procedures is applied twice in the production of traditional kaymak; in light of that fact the isolation of this serotype from our samples may be associated with defective pasteurization, the fecal contamination of product and/or poor hygiene after the production.

The pathogenicity of *E. coli* O157:H7/H- is associated with various virulence factors such as Shiga toxins, enterohemolysin and intimin (Karmali 2010, Bergan et al. 2012). Shiga toxins cause microvascular changes *in vivo* and are cytotoxic for selected cell lines *in vitro*, are known to be associated with HC, HUS and bloody diarrhea (Bergan et al. 2012). Although the influence of enterohemolysin produced by EHEC in the pathogenesis remains unclear, it has been considered that enterohemolysins may be used as the epidemiological marker for Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) strains (Farrokh et al. 2013). Another virulence factor intimin is responsible for the formation of attaching/effacing (A/E) lesions on intestinal epithelial cells (Karmali 2010). The low and high prevalence rates of genes encoding these virulence factors have been reported in *E. coli* O157:H7/H- strains isolated from milk and dairy products of cow and buffalo origin (Rahimi et al. 2012, Rantsiou et al. 2012, Douëllou et al. 2016, Nobili et al. 2016). Generally, it was shown that the prevalence of *Stx2* gene was higher than *Stx1* gene and *ehlyA* gene was the most common virulence gene in the strains. Many researchers also emphasized that *eaeA* gene had

high prevalence in the plurality of isolate number, while the absence of this gene pointed out in the paucity of isolates (Momtaz et al. 2012, Rantsiou et al. 2012, Douëllou et al. 2016, Nobili et al. 2016). In our study, all of 3 *E. coli* O157 strains harboured the *Stx1* and *ehlyA* genes (Figure 1), while the *Stx2* and *eaeA* genes were not found in the strains. Friedrich et al. (2002) reported that *Stx2* is clinically the most important *Stx* type and the probability of HUS development in infections from strains harbouring *Stx2* is higher than that of strains containing either *Stx1* or both *Stx1* and *Stx2*. However, some researchers emphasized the *Stx1*-producing and/or no Shiga toxin producing *E. coli* O157:H7/H- strains can also pose a potential risk for public health (Schmidt et al. 1999, Friedrich et al. 2002, Bergan et al. 2012). Similarly, numerous investigators underlined the strong association between the carriage of *eaeA* gene and the capacity of STEC to cause severe human disease, especially HUS (Beutin et al. 2004, Karmali 2010). Nevertheless, it was reported its production was not essential for pathogenesis, because a number of sporadic cases of HUS were caused by *eaeA*-negative strains (Karch et al. 2005). Geographical variations, the difference of tested material and the deficiency of strain number isolated in this study may be the reason for discrepancy in the distribution of virulence genes compared to results of other studies.

Antimicrobial resistance has been recognized as a global health problem for many decades and several programs have been set up for its surveillance in human and veterinary medicine. Some of the antibiotic resistance genes identified in food bacteria have also been identified in humans, providing indirect evidence for transfer by food handling and/or consumption (Founou et al. 2016). The use of antibiotics in the treatment of *E. coli* O157:H7/H- infections is controversial. Some authors reported that antimicrobials may lyse bacterial cell walls, thereby liberating Shiga toxins and/or cause increased expression of Shiga toxin genes *in vivo* (Wong et al. 2000), while others suggested that some antibiotics applied in the early period of infection may prevent disease progression to HUS and HC because of the susceptibility of many STEC O157:H7/H- isolates to numerous antimicrobials (Ikeda et al. 1999). In the investigations related to antibiotic resistance of *E. coli* O157:H7/H- strains isolated from milk and dairy products, the researchers emphasized the isolates showed the high resistance rates and/or multiple drug resistance (Momtaz et al. 2012, Rahimi et al. 2012, Reuben et al. 2013). In this study, the antibiotic resistance of 3 *E. coli* O157 strains isolated from traditional kaymak samples to 16 different antibiotics commonly used in Turkey was investigated by Kirby-Bauer disc diffusion test.

All of tested strains were resistant to cephalosporins, cefoxitin and ceftiofur, followed by ampicillin (66.7%), cephalothin (66.7%), ceftriaxone (33.3%), nalidixic acid (33.3%) and trimethoprim+sulfamethoxazole (33.3%) (Table 2). However, the resistance rates obtained from our study were insufficient to comment the resistance profiles of strains because of the low isolate number.

## CONCLUSIONS

In conclusion, the presence of *E. coli* O157 serotype and its major virulence genes in traditional kaymak was reported for the first time in Turkey. Afyonkarahisar located in Western Turkey has critical position in the breeding of dairy animals, especially water buffaloes, and the kaymak obtained from these animals have an important consumer portion in Turkey. Although an outbreak connected to *E. coli* O157:H7/H- has not been reported in Turkey so far, there is a need for awareness that kaymak, like other foods of animal origin, can pose a potential risk of *E. coli* O157 infections in human. Also, the data deficiency on the presence of this zoonotic pathogen in traditional kaymak in Turkey should be eliminated through with future investigations.

## REFERENCES

- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM.** Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010; 140: 360-370.
- Ko H, Maymani H, Rojas-Hernandez C.** Hemolytic uremic syndrome associated with *Escherichia coli* O157:H7 infection in older adults: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep.* 2016; 10: 1-4.
- Chapman PA, Siddons CA, Wright DJ, Norman P, Fox J, Crick E.** Cattle as a possible source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 infections in man. *Epidemiol Infect.* 1993; 111: 439-447.
- Upton P, Coia J.** Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with pasteurised milk supply. *Lancet.* 1994; 344: 1015.
- Kiranmayi CB, Krishnaiah N, Mallika EN.** *Escherichia coli* O157:H7-An emerging pathogen in foods of animal origin. *Vet World.* 2010; 3: 382-389.
- Bergan J, Lingelem ABD, Simm R, Skotland T, Sandvig K.** Shiga toxins. *Toxicon.* 2012; 60: 1085-1107.
- Ikeda K, Ida O, Kimoto K, Takatorige T, Nakanishi N, Tataru K.** Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin Nephrol.* 1999; 52: 357-362.
- Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL, Tarr PI.** The risk of hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *New Eng J Med.* 2000; 342: 1930-1936.
- TGK.** Türk Gıda Kodeksi. Türk Gıda Kodeksi-Krema Ve Kaymak Tebliği. Tebliğ No: 2003/34, R.G. Tarihi: 27.09.2003 R.G. Sayısı: 25242. 2003. (Erişim Tarihi: 12.03.2016).
- Siriken B., Erol I.** Microbiological and chemical quality of Afyon clotted cream. *J Anim Vet Adv.* 2009; 8: 2022-2026.
- Şenel E.** Some carbonyl compounds and free fatty acid composition of Afyon Kaymagı (clotted cream) and their effects on aroma and flavor. *Grasas Aceites.* 2011; 62: 418-427.
- Şeker E, Yardımcı H.** First isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from faecal and milk specimens from Anatolian water buffaloes (*Bubalus bubalus*) in Turkey. *J S Afr Vet Assoc.* 2008; 79: 167-170.
- Otawa K, Sato M, Sasaki T, Sasaki H, Nonaka J, Ito K, Kuroki T, Nakai Y.** Genetic analysis of shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates from cattle in a limited region. *Anim Sci J.* 2004; 75: 261-269.
- Osek J.** Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. *J Appl Microbiol.* 2003; 95: 1217-1125.
- Şeker E, Kuyucuoğlu Y, Sareyyüpoğlu B, Yardımcı H.** PCR detection of Shiga toxins, enterohaemolysin and intimin virulence genes of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated from faeces of Anatolian Water Buffaloes in Turkey. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57: e33-e37.
- CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty Third informational supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2013.
- Rantsiou K, Alessandria V, Cocolin L.** Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food products of animal origin as determined by molecular methods. *Int J Food Microbiol.* 2012; 154: 37-43.

- Sancak YC, Sancak H, Isleyici O, Durmaz H.** Presence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in raw milk and Van herby cheese. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2015; 59: 511-514.
- Tanzifi P, Bahrami AR, Rahimi E.** Study on antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O157:H7/NM isolated from raw bovine, camel, water buffalo, caprine and ovine milk. *Res J Recent Sci.* 2015; 4: 20-22.
- Douëllou T, Delannoy S, Ganet S, Mariani-Kurkdjian P, Fach P, Loukiadis E, Montel M, Thevenot-Sergennet D.** Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products - Genetic diversity and virulence gene profiles. *Int J Food Microbiol.* 2016; 232: 52-62.
- İpekçioğlu V.** Searching for some pathogenic bacteria in the Afyon kaymagi supplied to the market in Afyonkarahisar. MSc Thesis, University of Afyon Kocatepe, Institute of Health Sciences, Afyonkarahisar, Turkey, 2009.
- Farrokh C, Jordan K, Auvray F, Glass K, Oppegaard H, Raynaud S, Thevenot D, Condron R, de Reu K, Govaris A, Heggum K, Heyndrickx M, Hummerjohann J, Lindsay D, Miszczycha S, Moussiegt S, Verstraete K, Cerf O.** Review of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production. *Int J Food Microbiol.* 2013; 162: 190-212.
- Nobili G, Franconieri I, Basanisi MG, La Bella G, Tozzoli R, Caprioli A, La Salandra G.** Short communication: Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *J Dairy Sci.* 2016; 99: 7877-7780.
- Berry ED, Cutter CN.** Effect of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2000; 66: 1493-1498.
- Rahimi E, Momtaz H, Anari MMH, Alimoradi M, Momeni M, Riahi M.** Isolation and genomic characterization of *Escherichia coli* O157:NM and *Escherichia coli* O157:H7 in minced meat and some traditional dairy products in Iran. *Afr J Biotechnol.* 2012; 11: 2328-2332.
- Momtaz H, Farzan R, Rahimi E, Dehkordi FS, Souod N.** Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran. *Sci World J.* 2012; 2012: 231342.
- Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, Pulz M, Kuczius T, Ammon A, Karch H.** *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *J Infect Dis.* 2002; 185: 74-84.
- Schmidt H, Scheef J, Huppertz HI, Frosch M, Karch H.** *Escherichia coli* O157:H7 and O157:H- strains that do not produce Shiga toxin: phenotypic and genetic characterization of isolates associated with diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 3491-3496.
- Beutin L, Krause G, Zimmermann S, Kaulfuss S, Gleier K.** Characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1099-1108.
- Karch H, Tarr PI, Bielaszewska M.** Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol.* 2005; 295: 405-418.
- Founou LL, Founou RC, Essack SY.** Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1881.
- Reuben RC, Okolocha EC, Bello M, Tanimu H.** Occurrence and antibiogram of *Escherichia coli* O157:H7 in locally fermented milk (Nono) sold under market conditions in Nasarawa State, Nigeria. *Int J Sci Res.* 2013; 2: 591-598.

## Işık Mikroskopik Bir Çalışma: Devede Konjunktiva ile İlişkili Lenfoid Doku

Ahmet CEYLAN

*Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, ANKARA*

\*Corresponding author e-mail: ceylan@ankara.edu.tr

### ÖZ

Konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku (CALT), gözün en önemli aksesuar bileşenlerinden biridir. Bu çalışma, sağlıklı develerde konjunktiva ile ilişkili lenfoid dokunun histolojik dağılımını ve karakteristik özelliklerini ışık mikroskobu tekniğiyle ortaya koymak amacıyla yapıldı. Çalışmada toplam 5 adet (13-19 yaş aralığında) deveye ait alt ve üst göz kapağı kullanıldı. CALT'a ait genel makroskopik görünüm asetik asit uygulamasıyla ortaya konuldu. Tüm develerde CALT'ın en önemli elemanları olan ve soliter ve agregat lenf foliküllerinin varlığı tespit edildi. Foliküllerin üzerlerinin folikülle ilişkili epitel (FAE) olarak bilinen ve intra epitelyal lenfositleri barındıran, kadeh hücrelerinin görülmediği ince, yassılaştırmış epitel ile örtülü olduğu görüldü. Buna ek olarak, lenf foliküllerinin germinal merkez, korona, dom bölgesi ve inter foliküler alanlardan meydana geldiği fark edildi. İnterfoliküler alanlarda CALT en önemli karakteristik özelliklerinden bir olan, yüksek endotelli venüllerin varlığı ortaya konuldu. Sonuç olarak, deve CALT'ının sahip olduğu belirleyici özellikleriyle diğer mukozal lenfoid dokularla oldukça yüksek benzerlikler gösterdiği ve oküler savunma mekanizması içerisinde önemli bir rol oynadığı kanısına varıldı.

**Anahtar Kelime:** CALT, Deve, FAE, lenf folikülü, MALT

### A Light Microscopic Study: Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue in Camel

#### ABSTRACT

Conjunctiva-associated lymphoid tissue (CALT) is one of the most important accessory component of the eye. This study was undertaken to demonstrate the histological distribution and characteristic features of CALT in healthy camels using light microscopy technique. A total upper and lower eyelids of 5 (age range, 13-19) camels were investigated. The gross appearance of CALT were revealed by acetic acid application. Fully intact solitary and aggregated lymphoid follicles were observed as members of CALT in all camels. These follicles were covered by a thin, flattened epithelium called follicular-associated epithelium (FAE) that contained intra epithelial lymphocytes and lacked goblet cells. In addition germinal centers, corona, subepithelial dome region and interfollicular areas were noticed within the lymphoid follicles. The presence of high endothelial venules (HEV), a highly distinctive feature of CALT, was confirmed in interfollicular areas. We conclude that CALT of camel closely resembles other mucosal lymphoid tissues and may serve as an important member of ocular defense mechanism with its determinative features.

**Key Words:** CALT, camel, FAE, lymphoid follicle, MALT

## GİRİŞ

Oküler yüzey sürekli olarak birçok farklı patojen olan ya da olmayan etken ile karşı karşıya gelmektedir (Knop ve Knop, 2005a). Bu etkenlere karşı savunma mekanizmasının bütünlüğünün korunması ve devamlılığının sağlanması mukoza ile ilişkili lenfoid doku (Mucosa associated lymphoid tissue, MALT) ailesinin bir üyesi olan göz ile ilişkili lenfoid doku (Eye-associated lymphoid tissue, EALT) tarafından sağlanmaktadır. EALT, lakrimal bez, konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku (Conjunctiva-associated lymphoid tissue, CALT) ve lakrimal kanal ile ilişkili lenfoid dokundan (Lacrimal Drainage-Associated Lymphoid Tissue, LDALT) meydana gelmektedir (Knop ve Knop, 2000).

Hayvan türlerine göre yerleşimi ve yoğunluğu değişebilen ve bünyesinde farklı tipteki immun sistem hücrelerini barındıran CALT, EALT'ın konjunktival kısmını oluşturmaktadır (Chodosh ve ark., 1998, Bayraktaroğlu ve Aştı., 2009, Bayraktaroğlu, 2011). CALT, oküler yüzey ile dış ortam arasında immunolojik bir ara yüz oluşturarak, immun yanıtın başlatılmasında ve düzenlenmesinde anahtar rolü üstlenir. Antijenleri tespit ederek alımını gerçekleştiren CALT, sonrasında bu antijenleri işleyerek antijen sunan hücrelere sunar ve bunu takiben lenfoid hücrelerin direkt aksiyonu ya da antikor salınımı ile oküler yüzeydeki immun yanıtın oluşmasını sağlar (Knop ve Knop, 2002, Steven ve Gebert, 2009).

MALT ailesinin diğer üyelerinde olduğu gibi EALT'ın da iki farklı şekilde görüldüğü bilinmektedir. Bunlardan ilki "özelleşmiş" MALT (Organized, O-MALT) diğeri ise "yaygın" MALT'dan (Diffuse, D-MALT) oluşmaktadır (Russell ve ark., 2000, Hannant, 2002, Liebler-Tenorio ve Pabst, 2006).

CALT'ı mukozal immun sistem açısından önemli ve etkili kılan; MALT'ın temel özellikleri olarak bilinen, yüksek endotelli venüller (High endothelial venules, HEV), kadeh hücresi içermeyen ve antijen alımı için özelleşmiş membranöz epitel hücrelerini (M cells, M hücreleri) de içeren folikül ile ilişki epitel (Follicle-associated epithelium, FAE) ile dom ve korona bölgesi, germinal merkez, ve interfoliküler alanlar içeren agregat ve/veya soliter lenf foliküllerine sahip olmasıdır (Girard ve Springer, 1995, Neutra ve ark., 1996, Aştı ve ark., 2000b, Beyaz, 2004, Bayraktaroğlu, 2010 ).

Yaşam döngüsü içerisinde tür ve birey düzeyinde farklılıklar sergilemekle birlikte CALT'a ait lenf foliküllerinin sayısının yaşa bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Kessing, 1968). Özellikle ileri yaş grubu canlılarda yapılan çalışmalarda bu foliküllerin sayısında hızlı bir azalma görülse de tamamen yok olmadıkları tespit edilmiştir (Agnifili ve ark., 2014, Cain ve Phillips, 2008). Bunun yanı sıra lenf folikülü sayısının çeşitli hastalıklar, toksik

reaksiyonlar, otoimmun bozukluklara bağlı olarak da değiştiği gösterilmiştir (Siebelmann ve ark., 2013, Ambroziak ve ark., 2016). Bu çalışma, ülkemizde halen, ekonomik değere sahip ve bazı yörelerde ulaşım ve taşımacılık amacıyla kullanılan deveye ait CALT'ın makroskobik ve mikroskobik özelliklerini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak, ilerleyen yaşı nedeniyle (13,14,14,17 ve 19 yaşında) kesime sevk edilen 5 adet sağlıklı deveye ait alt ve üst göz kapaklarının konjunktivaları kullanıldı. Kesimi takiben toplanan materyalin bir kısmı lenf foliküllerinin yerleşimi ve dağılımını makroskobik olarak ortaya koymak amacıyla 24 saat boyunca %3'lük asetik asit ile muamele edildi (Fix ve Arp, 1991).

Kesim sonrası toplanan materyalin diğer kısmı ise ışık mikroskobik incelemeler için %10'luk tamponlu nötral formolde tespit edilerek, rutin ışık mikroskobu takibine tabi tutuldu ve paraplasta bloklandı. Bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere genel histolojik yapının ortaya konulması amacıyla Crossmon tarafından modifiye edilen Mallory'nin üçlü boyaması uygulandı (Crossmon, 1937). FAE'nin makromoleküler düzeydeki maddeleri pinositoz yolu ile hücre içine alımını göstermek amacıyla kesimden yarım saat önce develere 0,15 M NaCl<sub>2</sub> solüsyonunda hazırlanan, 25 mg/ml ferritin (Sigma F 4503) solüsyonu uygulandı. Ferritin partiküllerinin hücre içi varlığının gösterilmesi için 1 µm kalınlığında alınan yarı ince kesitlere de toluidine blue boyaması yapıldı. Tüm bulgular araştırma mikroskobunda (Leica DM 2500) değerlendirildikten sonra fotoğraflandı (Leica DFC450).

## BULGULAR

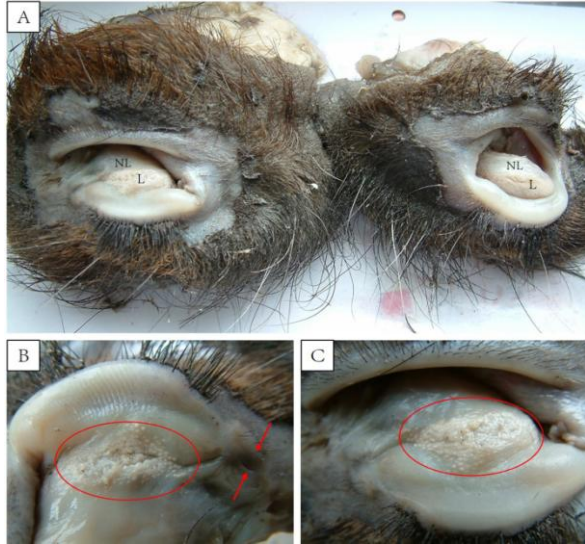
### Makroskobik Bulgular

Oldukça kalın oldukları tespit edilen her iki göz kapağının, asetik asit uygulamasını takiben CALT'a ait lenf foliküllerinin oluşturduğu lenfoid bölgelerinin belirginleşerek nonlenfoid bölgelerden kolaylıkla ayrıldığı görüldü. Konjunktivalar arasında lenf foliküllerinin sayı ve dağılım bakımından bireysel farklılıklar taşımadığı ve simetrik olduğu gözlemlenirken bütün örneklerde lenfoid dokunun oval şekilli lenf foliküllerinden oluştuğu tespit edildi. Alt konjunktivada, agregat lenf foliküllerine palpebra niktians ve palpebral konjunktivada yoğun olarak rastlanırken, üst konjunktivada ise palpebral konjunktivanın daha az sayıda ve medial açığa yakın bölgelerinde yerleşim gösteren lenf foliküllerine sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 1).

### Mikroskobik Bulgular

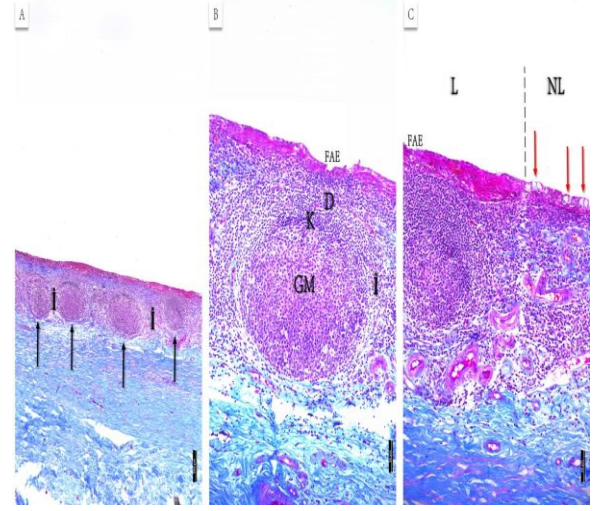


Makroskobik bulgularla uyumlu olarak mikroskobik düzeyde de lenfoid bölgeler ile nonlenfoid bölgelerin farklı karakterde histolojik özelliklere sahip olduğu görüldü. Nonlenfoid bölgelerin kadeh hücresi içeren çok katlı epitel ile örtülü olduğu görüldü. Mukozal lenf foliküllerinin epitele yaklaştığı alanlarda meydana getirmiş olduğu etkiye bağlı olarak, epitelin tek katlı yassı hale dönüşmesiyle FAE'nin biçimlendiği fark edildi (Şekil 2). Ayrıca immun sistem hücrelerinin bu alanlarda epitel ile yakın ilişkide olduğu ve bazılarının epitelin içinde intraepitelyal yerleşim gösterdiği dikkat çekti (Şekil 3). Antijen alınımında özelleşen FAE hücrelerinden olan M hücrelerinin varlığı yapılan ferritin uygulamaları ile gösterildi. Uygulanan ferritin partiküllerinin epitelden alınarak daha alttaki hücelere aktarıldığı gözlemlendi (Şekil 4). Bunun yanı sıra CALT'ı oluşturan lenfoid bölgelerdeki çoğunlukla O-MALT yapısında görülen soliter ya da agregat lenf foliküllerinin, FAE ile örtülü dom bölgesi, germinal merkez ve bu iki bölge arasında bulunan korona bölgesi ile interfoliküler alanlara sahip oldukları gözlemlendi. Korona bölgesinin heterokromatik çekirdekli hücrelerle bir kuşak oluşturduğu tespit edildi. Germinal merkezde ökromatik çekirdekli lenfoblastlara rastlanıldı. Özellikle epitelin hemen altında konumlanmış foliküllerin dip kısımlarında ve inter foliküler alanda yerleşim gösteren çevresi oldukça kalın bir bağ dokusu ile çevrili HEV'lerin varlığı saptandı. Buna ek olarak, HEV duvarı içinde ve çevresinde immun sistem hücrelerine rastlandı (Şekil 5).



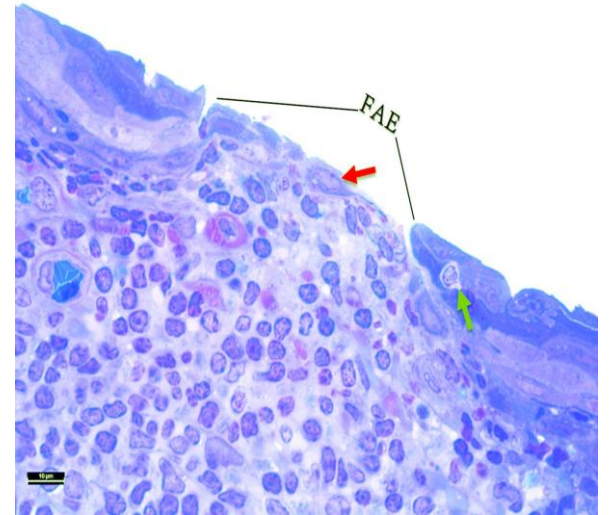
**Şekil 1. A.** Asetik asit uygulaması sonrasındaki CALT'ın makroskobik görünümü. Nonlenfoid bölgeler (NL), lenfoid bölgeler (L). **B ve C.** Agregat lenf folikülleri (daire). Nazolakrimal punktum (oklar).

**Figure 1. A.** Macroscopic appearance of CALT after acetic acid application. Nonlenfoid areas (NL), lenfoid areas (L). **B and C.** Aggregate lymphoid follicles (circle). Nasolacrimal punctum (arrows).



**Şekil 2. A.** Agregat lenf folikülleri (oklar), interfoliküler alanlar (I). **B.** Soliter lenf folikülü. Dom bölgesi (D), korona (K), germinal merkez (GM), folikül ile ilişkili epitel (FAE), interfoliküler alan (I). **C.** Nonlenfoid bölgeler (NL), lenfoid bölgeler (L), folikül ile ilişkili epitel (FAE), kadeh hücreleri (oklar). Mallory'nin üçlü boyaması.

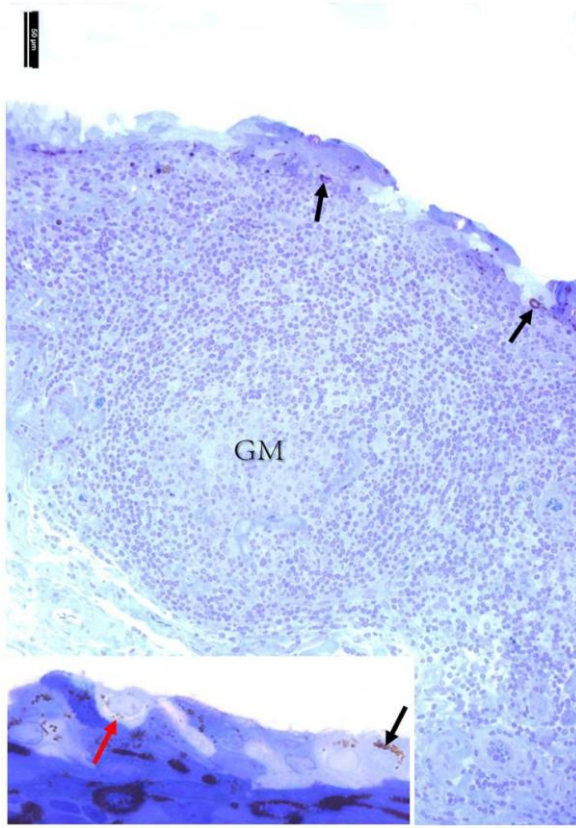
**Figure 2. A.** Aggregate lymphoid follicles (arrows). Interfollicular areas (I). **B.** A solitary lymphoid follicle. Dome area (D), corona (K), germinal center (GM), follicle associated epithelium (FAE), interfollicular area (I). **C.** Nonlenfoid areas (NL), lenfoid areas (L), follicle associated epithelium (FAE), goblet cells (arrows). Mallory's trichrome stain.



**Şekil 3.** Folikül ile ilişkili epitel (FAE), M hücresi (kırmızı ok), intraepitelyal lenfosit (yeşil ok). Toluidine blue boyaması.

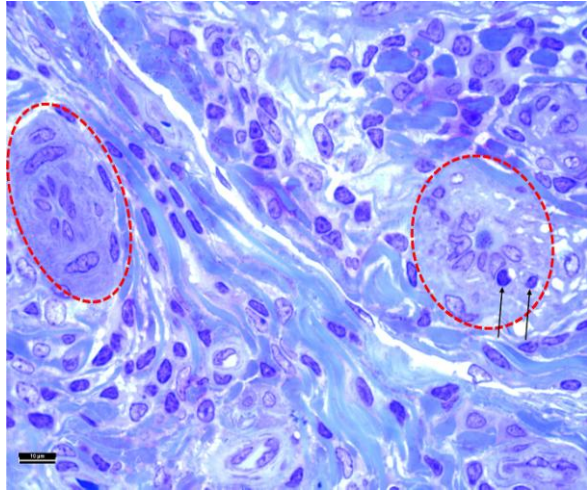
**Figure 3.** Follicle associated epithelium (FAE), M cell (red arrow), intraepitheal lymphocyte (green arrow). Toluidine blue staining.





**Şekil 4.** FAE hücreleri tarafından hücre içine alınmış ferritin partikülleri (siyah oklar), M hücresi (kırmızı ok), germinal merkez (GM). Toluidine blue boyaması.

**Figure 4.** Ferritin particles within FAE cells (black arrows), M cell (red arrow), germinal center (GM). Toluidine blue staining.



**Şekil 5.** HEV'ler (daireler) ve immun sistem hücre trafiği (oklar). Toluidine blue boyaması.

**Figure 5.** HEVs (circles) and immune system cell traffic (arrows). Toluidine blue staining.

## TARTIŞMA

CALT, gözdeki diğer immun yapılarla birlikte oküler yüzeyin sağlığının korumasında kilit rol üstlenmektedir. Yerleşimi göz önünde

bulundurulduğunda, gözün dış ortamla arasında bulunan ilk bariyer olan CALT, oküler yüzeye ait immun toleransın düzenlenmesine ve birçok yangısal hastalığa karşı verilecek immun yanıtın temel basamaklarının şekillenmesine katkıda bulunur (Zhivov ve ark., 2006, Siebelmann ve ark., 2013). CALT'ın bu özelliklerini başarılı bir şekilde yerine getirebilmesi için MALT'a ait karakteristik özelliklere sahip olması gerekmektedir (Knop ve Knop, 2005b). Literatürde de CALT'ına ait lenf foliküllerinde bulunan özellikle T lenfosit (Sandıkçı ve ark., 2005), IgG ve IgA salgılayan hücrelerin (Zhang ve ark., 2016) varlığının ve dağılımının gösterildiği çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda CALT'ın temel yapısal özellikleri makroskobik ve mikroskobik olarak detaylı bir şekilde gösterilmemiştir. Bizim çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak bahsi geçen karakteristik yapısal unsurlar ayrıntılı bir şekilde incelenerek ortaya konulmuştur.

Alt ve üst göz kapaklarındaki CALT'ın yerleşimi ve yoğunluğu türler arasında farklılıklar göstermektedir. Koyun, domuzda (Chodosh ve ark., 1998) ve sığırdaki (Bayraktaroğlu ve Aştı, 2009) palpebral konjunktivada, köpek (Guiliano ve ark., 2002) ve farede (Sakimoto ve ark., 2002) palpebra niktians'a yerleşen lenf foliküllerinin, tavşanda (Bayraktaroğlu ve ark., 2010) alt konjunktivanın nazal açısında lakrimal punktuma yakın bölgelerde, tavukta (Fix ve Arp, 1991) ise nazal açıda bulunduğu bildirilmektedir. Sığır, maymun (Ruskell, 1995), tavşan, tavuk ve hindide genellikle alt konjunktivada daha yoğun bir yerleşim gösteren CALT, insanlarda (Knop ve Knop, 2000) tam tersi yerleşim gösterir. Çalışmamızda alt konjunktivada üste oranla daha yoğun bir CALT dağılımı olduğu tespit edildi. Bu durum develerde oküler enfeksiyonların ya da patojenik olmayan çevresel etkilerin daha çok alt göz kapağına yerleşim gösterme olasılığı ile ilişkilendirilebilir. CALT'ta bulunan lenf foliküllerinin makroskobik morfolojilerinin de türler arasında farklılıkları olduğu gösterilmiştir. İnsanlardaki (Knop ve Knop, 2000) lenf folikülleri, disk şeklinde tanımlanırken tavşan (Bayraktaroğlu ve ark., 2010), maymun (Ruskell, 1995), ve diğer memeli türlerinde (Chodosh ve ark., 1998) daha çok oval biçimde tanımlanmaktadır. Devede ise lenf foliküllerinin insanlardan farklı, diğer türleri ile ise benzer makroskobik morfolojiye sahip olduğu görüldü.

Araştırmalarda, konjunktivanın ışık mikroskobik olarak nonlenfoid ve lenfoid bölgelerden meydana geldiğini bildirilmektedir. Lenfoid bölgelerin tepe kısımları kadeh hücresinden yoksun inceliş FAE ile örtülü soliter ya da agregat lenf foliküllerinden oluşurken, nonlenfoid bölgelerin ise kadeh hücreli 2-5 sıralı çok katlı yassı epitelden oluştuğu gösterilmiştir (Aştı ve ark., 2000a, Liebler-Tenorio ve Pabst, 2005, Bayraktaroğlu ve ark., 2011). MALT

ailesinin bir üyesi olan CALT'ın lenf foliküllerinde, germinal merkez, korona bölgesi, interfoliküler bölgelerin ve subepiteliyal dom bölgesinin bulunduğu ortaya konulmuştur. (Chodosh ve Kennedy, 2002, Bayraktaroğlu ve ark., 2010). Çalışmamızda elde edilen bulgular deve CALT'ının diğer türlerde tanımlanan CALT'lar ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Kuşlarda yapılan bir çalışmada (Klečkowska-Nawrot ve ark., 2017) üç farklı kuş türünde bizim bulgularımızdan farklı olarak konjunktivanın lenfoid bölgesine ait epitelde kadeh hücrelerinin görüldüğü ortaya konulmuştur. Bu durum, nonspesifik bir mekanizma olan mukus salgılamasının develerde, FAE içinde yerleşim gösteren M hücrelerinin antijen alımı sürecine olumsuz bir etkisinin olabileceği ihtimalini akla getirmektedir.

MALT'ın diğer bir karakteristik özelliği olan ve lenfositlerin doku spesifik göçlerinde taşıdıkları özel adezyon molekülleri vasıtasıyla görev alan HEV'ler CALT içinde tanımlanmıştır (Girard ve Springer, 1995, Aştı ve ark., 2000b, Chodosh ve Kennedy, 2002, Liebler-Tenorio ve Pabst, 2006). Hayvan türleri arasında HEV'in yapısının farklılık gösterdiği, venüllerin sayısı ve uzunluğunun antijenik uyarımla bağlantılı olarak değiştiği bildirilmektedir (Anderson ve ark., 1978, Knop ve Knop, 2000). Tavuklarda lenf foliküllerinin dip kısımlarında yerleşim gösteren HEV'in kübik endotel hücrelerinden meydana geldiği bildirilmiştir (Fix ve Arp, 1991). Çalışmamızda tavukların aksine, develerde HEV endotelinin yüksek endotel yapısında olduğu tespit edildi. Endotel yapısındaki farklılığın yüksek ihtimalle lenfosit trafiğinin ve diapedez mekanizmasının türler arasında değişiklik göstermesinden kaynaklanıyor olabileceği kanısına varıldı.

Literatürde konjunktival lenf foliküllerinin sayısının ve dağılımının yaş ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiş olup ilerleyen yaşam süresiyle birlikte lenf foliküllerinin sayısında dramatik bir azalım olduğu ortaya konmuştur (Kessing, 1968, Cain ve Phillips, 2008, Siebelmann ve ark., 2013, Agnifili ve ark., 2014). Çalışmamızda kullanılan develerin ileri yaşları nedeniyle kesime sevk edilmiş hayvanlar olmalarına rağmen; yapılan incelemelerde CALT yapısının yaygın ve yoğun bir şekilde bulunmasının nedeni, develerin yaşam koşullarına bağlı geliştirmiş oldukları bir adaptasyon olarak açıklanabilir. Nitekim develerdeki göz hastalıkları üzerine yapılan bir çalışmada (Fahmy ve ark., 2003) develerin oküler enfeksiyonlara yakalanma oranlarının diğer ruminantlara oranla belirgin bir şekilde daha az olduğunu saptamışlardır.

## SONUÇ

Sonuç olarak, EALT'ın konjunktivadaki üyesi CALT'ın develerde diğer türlerde tanımlanan

özellikleri taşıdığı ve ileri yaşlarda bile yoğunluğunu koruduğu, ışık mikroskopik olarak agregat ve soliter tarzda dağılım gösteren lenf folikülleri içerdiği ve bunların epitel ile yakın ilişkide olduğu, FAE'de antijen alımı yapabilen M hücrelerinin varlığı ve HEV'lerin yapısı ortaya konuldu. Elde edilen histolojik bulgular ile CALT'ın develerdeki oküler savunma mekanizmasında görev alan önemli bir yapısal unsur olduğu kanısına varıldı.

## Teşekkür

Yazar, çalışmanın araştırma ve kaleme alınma aşamasında değerli katkılarını esirgemeyen Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU'na teşekkürü bir borç bilir.

## KAYNAKLAR

- Agnifili L, Mastropasqua R, Fasanella V, Di Staso S, Mastropasqua, A, Brescia L, Mastropasqua, L.** In vivo confocal microscopy of conjunctiva-associated lymphoid tissue in healthy humans in vivo confocal microscopy of CALT. *Invest Ophth Vis Sci.* 2014; 55(8): 5254-5262.
- Ambroziak AM, Szaflik J, Szaflik JP, Ambroziak M, Witkiewicz J, Skopiński P.** Immunomodulation on the ocular surface: a review. *Cent Eur J Immunol.* 2016; 41(2): 195-208.
- Anderson ND, Anderson AO, Wyllie RG.** Specialized structure and metabolic activities of high endothelial venules in rat lymphatic tissues. *Immunol.* 1976; 31:455-473.
- Aştı RN, Kurtdede N, Altunay H, Özen A.** Electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue(CALT) in Angora goats. *Dtsch Tierarztl Wschr.* 2000a; 107: 196-198.
- Aştı RN, Kurtdede N, Altunay H, Özen A.** Light microscopic studies on the conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) of Angora goats. *AÜ Vet Fak Derg.* 2000b; 47: 31-37.
- Bayraktaroğlu AG, Aştı RN.** Light and electron microscopic studies on conjunctiva associated lymphoid tissue (CALT) in cattle. *Revue Med Vet.* 2009; 160(5): 252-257.
- Bayraktaroğlu A, Ergün E, Beyaz F, Ertuğrul T.** Ankara tavşanında konjunktiva ile ilişkili lenfoid doku. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg.* 2010; 7(1): 21-27.
- Bayraktaroğlu AG, Korkmaz D, Aştı RN, Kurtdede N, Altunay H.** Conjunctiva associated lymphoid tissue in the ostrich

- (*Struthio camelus*). Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2011; 17(1): 89-94.
- Beyaz F.** M cells: membranous epithelial cells. Erciyes Univ Vet Fak Derg. 2004; 1: 133-138.
- Cain C, Phillips TE.** Developmental changes in conjunctiva-associated lymphoid tissue of the rabbit. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2008; 49(2): 644-649.
- Chodosh J, Kennedy RC.** The conjunctival lymphoid follicles in mucosal immunology. DNA Cell Biol. 2002; 21: 421-433.
- Chodosh J, Nordquist RE, Kennedy RC.** Comparative anatomy of mammalian conjunctival lymphoid tissue: a putative mucosal immune site. Dev Comp Immunol. 1998; 22: 621-630.
- Crossmon G.** A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. Anat. Rec. 1937; 241: 155.
- Fahmy LS, Hegazy, AA, Abdelhamid MA, Hatem ME, Shamaa AA.** Studies on eye affections among camels in Egypt: clinical and bacteriological studies. Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences). 2003; 4(2): 14-24.
- Fix AS, Arp LH.** Morphologic characterization of conjunctiva-associated lymphoid tissue in chickens. Am J Vet Res. 1991; 52: 1852-1859.
- Girard JP, Springer TA.** High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. Immunol Today. 1995; 16 (9): 449-457.
- Guiliano EA, Moore CP, Phillips TE.** Morphological evidence of M cells in healthy canine conjunctiva-associated lymphoid tissue. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol. 2002; 240: 220-226.
- Hannant D.** Mucosal immunology: overview and potential in the veterinary species. Vet Immunol Immunopathol. 2002; 87: 265-267.
- Kessing SV.** Mucous gland system of the conjunctiva. A quantitative normal anatomical study. Acta Ophthalmol Suppl. 1967; 95: 91.
- Klećkowska-Nawrot JE, Goździewska-Harłajczuk K, Łupicki D, Marycz K, Nawara T, Barszcz K, Łukaszewicz E.** The differences in the eyelids microstructure and the conjunctiva-associated lymphoid tissue between selected ornamental and wild birds as a result of adaptation to their habitat. Acta Zool. 2017; 00: 1-28.
- Knop E, Knop N.** Conjunctiva-associated lymphoid tissue in the human eye. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2000; 41: 1270-1279.
- Knop E, Knop N.** A functional unit for ocular surface immune defense formed by the lacrimal gland, conjunctiva and lacrimal drainage system. Adv Exp Med Biol. 2002; 506: 835-844.
- Knop E, Knop N.** The role of eye-associated lymphoid tissue in corneal immune protection. J Anat. 2005a; 206: 271-285.
- Knop E, Knop N.** Influence of the eye-associated lymphoid tissue (EALT) on inflammatory ocular surface disease. Ocul Surf. 2005b; 3:180-187.
- Liebler-Tenorio E, Pabst R.** MALT structure and function in farm animals. Vet Res. 2006; 37: 257-280.
- Neutra MR, Pringault E, Kraehenbuhl JP.** Antigen sampling across epithelial barriers and induction of mucosal immune responses. Annu Rev Immunol. 1996; 14: 275-300.
- Ruskell GL.** Organization and cytology of lymphoid in the cynomolgus monkey conjunctiva. Anat Rec. 1995; 243: 153-164.
- Russell MW, Martin MH, Wu H, Hollingshead SK, Moldoveanu Z, Mestecky J.** Strategies immunization against mucosal infections. Vaccines. 2000; 19: 122-127.
- Sakimoto T, Shoji J, Inada N, Saito K, Iwasaki Y, Sawa M.** Histological study of conjunctiva-associated lymphoid tissue in mouse. Japanese J Ophthalmol. 2002; 46: 364-369.
- Sandıkçı M, Eren Ü, Kum S.** Alphanaphthyl acetate esterase activity in the spleen, lymph nodes and conjunctiva-associated lymphoid tissues of camels (*Camelus dromedarius*). Revue Med Vet. 2005; 156: 99-103.
- Siebelmann S, Gehlsen U, Hüttmann G, Koop N, Bölke T, Gebert A, Steven P.** Development, alteration and real time dynamics of conjunctiva-associated lymphoid tissue. PloS one. 2013; 8(12):1-13.
- Steven P, Gebert A.** Conjunctiva-associated lymphoid tissue – current knowledge, animal models and experimental prospects. Ophthalmic Res. 2009; 42: 2-8.
- Zhang XF, Li SX, Li H, Dou SY, Zhang WD, Jia S, Wang WH.** IgA and IgG secreting cells in CALT of Bactrian camel. Chinese Journal of Veterinary Science. 2016; 2: 1-32.
- Zhivov A, Stachs O, Kraak R, Stave J, Guthoff RF.** In vivo confocal microscopy of the ocular surface. Ocul Surf. 2006; 4: 81-93.

## Neonatal İshalli Buzağlarda İki Farklı Hematokrit Ölçüm Tekniğinin Karşılaştırılması

Hasan ERDOĞAN\*, Mehmet GÜLTEKİN, Serdar PAŞA, Kerem URAL

*Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın/TÜRKİYE*

\*Corresponding author e-mail: hasan.erdogan@adu.edu.tr

### ÖZ

Bu çalışmada veteriner hekimlikte sıklıkla kullanılan hücre sayımı temel prensipli ve amperometrik yöntem ile ölçüm yapan iki farklı hematokrit ölçüm tekniğinin karşılaştırılması amaçlandı. Farklı etiyojileri bulunan her iki cinsiyetten toplam 84 neonatal ishallerli buzağı çalışmaya dahil edildi. Hematokrit ölçümleri için buzağlardan lityum heparin içeren kan gazı enjektörlerine ve tüplere kan örnekleri, toplamda 4 ml olacak şekilde alındı. Hematokrit ölçümleri için Abacus Junior Vet 5 kan sayım cihazı ve Irma Truepoint kan gazı analiz cihazından yararlanıldı. Linear regresyon analizi ve pearson korelasyonu sonuçlarına göre hematokrit ölçümlerinden elde edilen verilerin her iki ölçüm tekniği arasında  $r=0.90$  ( $p<0.000$ ) düzeyinde pozitif yönde korelasyona sahip olduğu, ancak iki test tekniğinin ortalama değerleri arasında istatistiksel yönden farklılıkların bulunduğu belirlendi. Passing-bablok regresyon analizinde ise  $y= 0.88x+1.81$  denklemi elde edildi. Çalışma sonuçlarına göre, klinikte yoğun şekilde yapılan hematokrit ölçümlerinin değerlendirilmesinde her iki ölçüm tekniğinden yararlanılabileceği ancak iki ölçüm metodu arasında farklılıkların bulunmasına bağlı olarak hasta hayvanlarda şüpheye düşüldüğü durumlarda klasik santrifüj yöntemine dayalı mikrohematokrit ölçümlerinin yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** Buzağı, Hematokrit, İshal, Ölçüm tekniği, Passing-bablok

### Comparison of Two Hematocrite Measurement Methods in Diarrheic Neonatal Calves

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to compare two different hematocrit measurement techniques which are commonly used in veterinary medicine by cell count, and amperometric method. A total of 84 neonatal diarrheic calves from both sexes with different etiologies were included in the study. For hematocrit measurements, blood samples (4 ml) were taken to blood gas injectors and tubes containing lithium heparin from calves. The Abacus Junior Vet 5 whole blood cell counter and Irma True Point blood gas analyzer were used for hematocrit measurements. According to the results of linear regression analysis and Pearson correlation, it was determined that the data obtained from the hematocrit measurements had positive correlations between  $r = 0.90$  ( $p < 0.000$ ) between the two measurement techniques, but statistically significant differences were found between the mean values of the two test techniques. In Passing-bablok analysis  $y = 0.88x + 1.81$  equation was found. According to the results, both measurements can be utilized in assessing hematocrit measurement, but in case of the difference between the two measuring methods, it was concluded that suspected cases should be made based on the conventional measurement microhematocrit centrifugation.

**Keywords:** Calf, Diarrhoea, Hematocrit, Measurement technique, Passing-bablok

*To cite this article: Erdoğan H, Gültekin M, Paşa S, Ural K. Neonatal İshallerli Buzağlarda İki Farklı Hematokrit Ölçüm Tekniğinin Karşılaştırılması. Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 24-29.*

## GİRİŞ

Hematokrit değer toplam kan içerisindeki hücresel elemanların hacimsel dağılımlarını ifade etmekte ve paketlenmiş hücre volümü olarak da isimlendirilmektedir. Hematokrit ölçümleri yalnızca hastaların kan volümündeki değişimlerin değerlendirilmesinde değil aynı zamanda laboratuvarların rutin konvansiyonel değerlendirmelerinde kalite kontrol programları içerisinde de değerlendirilen parametreler arasındadır (CLSI 2000, Kathleen 2007). Hematokrit değerlerin belirlenmesi sırasında laboratuvar ortamında yapılabilecek hataların hastaların klinik değerlendirmelerinin ve takiplerinde meydana gelebilecek geri dönüşümsüz sonuçlar doğurabileceğinden ölçümlerin muhakkak güvenilir ve doğru sonuçlar vermesi gerekmektedir (Brian ve Karen 2001, Bull ve ark. 2003). Son yıllarda, gelişen teknoloji ile birlikte hematokrit ölçümlerinin gerçekleştirilmesi için hızlı ve kolay yöntemler geliştirilmiştir. Bu teknikler kısaca 1) Klasik mikrohematokrit ölçümleri 2) tam kan sayımı 3) kan gazı cihazları 4) toplam hemoglobinin konsantrasyonları ile hesaplamalardır (Bull ve ark. 2000, Linne ve Ringsrud 1999). Tam kan sayım cihazları ile yapılan ölçümlerin prensibi, eritrosit sayılarının ve büyüklüklerinin hesaplanması temeline dayanırken (Anonim), kan gazı cihazları ise toplam kan içerisindeki iyonların oluşturduğu elektriksel iletkenliğe dayalı olarak gerçekleştirilmektedir (Mock ve ark. 1995). Her iki teknik de tam kan içerisindeki toplam iyon dengesi, total protein konsantrasyonları ve beden ısısı gibi değişimlerden etkilendiği için kullanımlarında yanlış sonuçlar verebilmekte ve belirli sınırlamalara sahip olduğu görülmektedir (Stott ve ark. 1995). Özellikle ishalleri buzağular göz önüne alındığında ishal etiolojisindeki farklılıklara bağlı olarak vücut sıcaklığı, total protein konsantrasyonları ve iyon dengesinin değiştiği görülmektedir. Veteriner hastanelerin sahip olduğu laboratuvar olanakları da göz önüne alındığında hematokrit ölçümleri için altın standart ölçüm tekniği olan mikrohematokrit ölçümlerinin terk edilmeye başlandığı görülmektedir. Söz konusu çalışmada veteriner sahada hematokrit ölçümlerinin değerlendirilmesinde sıklıkla kullanılan tam kan sayımı ve amperometrik bir yöntem olan kan gazı analizörlerinden elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

### Hayvan Materyali

Çalışmada kullanılan hayvanlar Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı büyük hayvan kliniklerine Ağustos 2015

ve Mayıs 2017 yılları arasında farklı etiyojilere bağlı ishal şikâyeti ile getirilen hayvanlardan seçildi. Bu kapsamda her iki cinsiyetten, Holştayn ırkı, toplam 84 ishalleri buzağıya ait hematokrit ölçüm sonuçlarından yararlanıldı.

### Kan örneklerinin alınması ve Hematokrit ölçümleri

İshal şikâyetine sahip ve farklı derecelerde dehidrasyonu bulunan buzağuların rutin klinik değerlendirmelerinin yapılabilmesi için *V.jugularis*' den toplamda 4 ml olacak şekilde lityum heparin içeren kan gazı enjektörüne (BD, Almanya) ve tüplere (Vacutte, Amerika) kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinden tekniğine uygun olarak tam kan sayımı işlemi (Abacus Junior Vet, Macaristan) ve kan gazı analizi (Irma True Point, Amerika) değerlendirmeleri yapıldı.

### İstatistiksel analizler

Her iki ölçüm tekniği kullanılarak elde edilen hematokrit değerlerin normalite testleri yapıldı. Kolmogorov-Smirnov analizi sonuçlarına göre değerlendirildi ve dağılımların normal olduğu belirlendi. Her iki tekniğin sonuçları doğrusal regresyon analizi ve Pearson korelasyonuna göre değerlendirildi. Bland altman ve Passing-Bablok plot regresyon testlerinin değerlendirilmesinde XLSTAT (Free Trial Version) paket programından regresyon analizleri için ise SPSS 15.0 paket programından yararlanıldı. Tüm analizler de  $p < 0,05$  değeri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

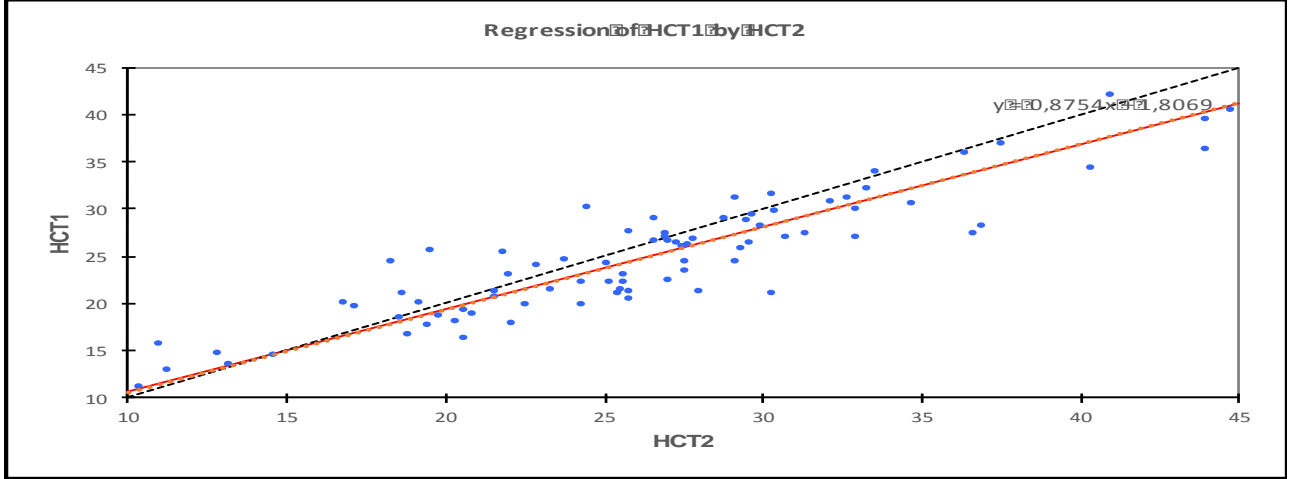
Lineer regresyon analizi ve Pearson korelasyonu sonuçlarına göre her iki ölçüm tekniğinden elde edilen hematokrit sonuçlarının arasında  $r=0.90$  ( $p < 0.000$ ) düzeyinde pozitif yönde anlamlı korelasyon olduğu belirlendi. Kan sayım cihazından (HCT1) ve Kan gazı ölçüm cihazından (HCT2) elde edilen verilerin ortalamaları karşılaştırıldığında her iki ölçüm tekniği arasındaki grup ortalamalarının ( $24,8 \pm 0,70 - 26,3 \pm 0,8$ ) birbirinden istatistiksel anlamlı farklı olduğu tespit edildi. Passing-bablok analizi sonuçlarında  $y=0.88x+1.81$  denklemi elde edildi (Şekil 1,2).

## TARTIŞMA

İnsan hekimliği ve veteriner hekimliği alanında hematokrit ölçümlerinin değerlendirilmesi hastanın anemi durumunu, dehidrasyon derecesini, kan kayıplarını ya da diğer laboratuvar parametrelerinin değerlendirilmesinde özellikle de hasta başı hızlı testlerin güvenilirliklerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasındadır (McMahon ve ark. 1990, Kronenberg ve ark. 1998,

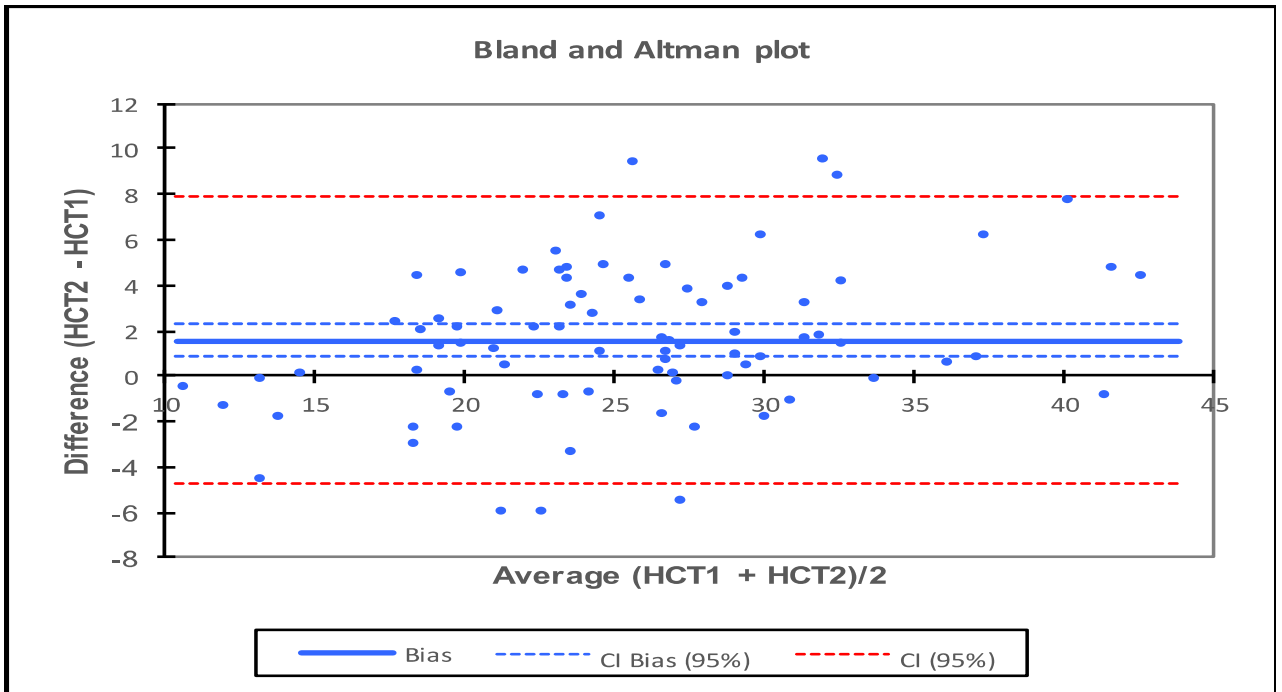
Rao ve ark. 2005). Hematokrit ölçümleri arasında mikrohematokrit ölçümleri halen altın standart metot olarak belirtilmekte ve diğer ölçüm tekniklerinin karşılaştırılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Gebretsadkan ve ark. 2015). Bunun yanında hasta başı ölçüm tekniklerinin de

karşılaştırıldığı araştırmalar da bulunmaktadır (Peiro ve ark. 2010). Söz konusu çalışmada ise ishali buzağuların rutin klinik değerlendirmelerinde sıklıkla kullanılan tam kan sayımı ve kan gazı analizinden elde edilen hematokrit ölçümleri karşılaştırılmıştır.



**Şekil 1.** Buzağulardan elde edilen kan örneklerinin tam kan ve kan gazı analiz HCT ölçümlerinin Passing-Bablok plot regresyon analizi. HCT1: Kan sayım cihazı sonuçları, HCT2: Kan gazı analizatörü sonuçları

**Figure 1.** Comparison between cell counter and blood gas analyzer methods for measurement of HCT in blood samples from calves. Passing-Bablok plot regression test. HCT1: Cell counter results, HCT2: Blood gas analyser results.



**Şekil 2.** Buzağulardan elde edilen kan örneklerinin tam kan ve kan gazı analiz HCT ölçümlerinin Bland and Altman difference plot analizi. HCT1: Kan sayım cihazı sonuçları, HCT2: Kan gazı analizatörü sonuçları

**Figure 2.** Comparison between cell counter and blood gas analyzer methods for measurement of HCT in blood samples from calves. Bland and Altman difference plot. HCT1: Cell counter results, HCT2: Blood gas analyser results.



Neonatal buzağlarda ishal sonucu gelişen dehidrasyona bağlı HCT değeri ile HGB, serum TP ve albümin konsantrasyonlarında artışla laboratuvar olarak ortaya konulmaktadır. Söz konusu parametrelerdeki bu artışlar ve düzeyleri ishali şiddeti ve süresi ile yakından ilişkilidir (Slanina 1988, Hartmann ve Reder 1995, Constable ve ark 1998). İshalli buzağlarda özellikle dehidrasyona bağlı olarak gelişen bu değişimler göz önüne alındığında hematokrit ölçüm tekniklerinin birbiri ile uyumlu olması ve güvenilir sonuçlar vermesi gerektiği görülmektedir. Çalışmamızda tam kan sayımı ve kan gazı analizörü sonuçlarına göre her iki ölçüm tekniğinden elde edilen bulguların  $r=0,90$  düzeyinde pozitif yönde anlamlı bir korelasyonunun bulunduğu ancak değerlerin ortalamalarının istatistiksel anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi. Köpek ve kedi kanlarının hematokrit ölçümlerinin manuel ve otomatik cihazlar ile karşılaştırılmasında otomatik cihaz ile elde edilen sonuçların doğruluğunun ve güvenilirliğinin yeteri derece olmadığı bildirilmektedir (Prihirunkit ve ark. 2008). Kan transfüzyonu uygulanan hastalarda ise infüzyon sonrası değerlendirmelerin yapılması amacı ile de hematokrit ölçümlerinden yararlanılmaktadır. Bu kapsamda transfüzyon işlemi uygulanan insanlardan alınan kan örnekleri klasik metot ve elektriksel iletim değişimleri bazlı hematokrit ölçümleri ile değerlendirilmiş ve sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ancak hastaların kristalloid sıvıları alanlarda ve plazma iyon dengesizlikleri bulunanlarda sonuçların klasik metoda göre farklılıklar gösterdiği bildirilmektedir (McMahon ve ark. 1990).

Stott ve ark. (1995), kan gazları cihazı, tam kan sayım cihazı ve klasik mikrohematokrit ölçümlerini insan hastalarda karşılaştırmış ve konduktivite bazlı ölçüm tekniklerinin elektrolit ve protein kompozisyonu sağlıklı insanlarda güvenilir sonuçlar verdiğini göstermiştir. Tam kan sayım cihazının hematokrit ölçümlerinin klasik metot ölçümleri ile yapılan başka bir karşılaştırma araştırmasında ise klasik metot ölçümlerinin birbirine yakın sonuçlar verdiğini ve aralarında yüksek düzeyde pozitif yönlü korelasyon bulunmasına rağmen bu değerlerin klasik metodun yerini alabilecek ölçüde olmadığı tespit edilmiştir (Gebretsadkan ve ark. 2015).

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarında beşeride yapılan diğer araştırmalar (McMahon ve Carpenter 1990, Peiró ve ark. 2010, Gebretsadkan ve ark. 2015) ile uyumlu sonuçların bulunduğu belirlendi. İshalli buzağlarda serum total protein konsantrasyonları ve hematokrit değeri üzerinden hemokonsantrasyona bağlı beklenen değişimlerin hesaplanması ile dehidrasyon derecesi ortaya

konulabilmektedir (Şen ve Constable 2013). Genellikle artış yönünde şekillenen bu değişimlerin protein katabolizmasına ve bağırsak lümenine sızıntı sebebi ile azalma eğiliminde de olabileceği bildirilmektedir (El-sheikh ve ark 2012). Neonatal ishali buzağlarda dehidrasyon ve metabolik asidozis yanında elektrolit anormallikleri şekillendiği bir çok araştırmacı tarafından belirtilmektedir (El-sheikh ve ark 2012, Smith ve Berchtold 2014). Çalışmamızda kan gazı analizatörü ile gerçekleştirilen ölçümlerin (HCT2) araştırmada kullanılan buzağlarda meydana gelebilecek olası total protein ve elektrolit seviyelerindeki değişimlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Özellikle iki ölçüm tekniği arasında bulunan yüksek korelasyona rağmen ortalama değerler arasında anlamlı farklılıkların bulunması kan gazı prensibi temelinde yapılan ölçümlerde hatalı sonuçların alınmasına sebebiyet verebileceği belirlendi. Etilen diammin tetraasetik asit (EDTA) kullanımına bağlı olarak plazma osmotik basıncında artışlar olabileceği ve bu durumda eritrositlerin büzülmesine neden olarak HCT ölçümlerinde hatalı sonuçlar şekillendirebileceği bildirilmektedir (Dubin ve ark. 1976). Farklı bir araştırmada ise EDTA kullanımının HCT değeri üzerine olumsuz etkisinin bulunmadığı bildirilmektedir (Bamberg ve ark. 2008). Bununla birlikte heparinin benzer etkisinin yalnızca trombositler üzerine göstermesi sebebi ile hematokrit konsantrasyonlarını etkilemediği ve söz konusu ölçümler için kullanılabilir olacak antikoagülanlar arasında yer aldığı bildirilmektedir (Pennock ve Jones 1966, Dubin ve ark. 1976). Çalışmamızda tam kan sayımı ve kan gazı ölçümlerinde kullanılan tüp ve enjektörlerde antikoagülan ajan olarak heparin kullanılmış ve ölçümlerin antikoagülan ajandan etkilenme derecesinin minimize edilmesi sağlanmıştır. Söz konusu cihazlar yardımı ile yapılan hematokrit ölçümlerinin doğruluğunun ve güvenilirliğinin yüksek olması hematokrit değerini baz alınarak her iki cihaz içerisinde de hesaplamaya dayalı değerlerde de değişimler gerçekleştirebilmektedir (Kronenberg ve ark. 1998, Lokinendi ve ark. 2005).

Sonuç olarak araştırma kapsamında kullanılan her iki hematokrit ölçüm tekniğinin birbirine pozitif yönde yüksek korelasyon gösterdiği ve kullanılabilir olduğu tespit edildi. Kan gazı ölçümlerinin HCT değeri ortalamasının, kan sayım cihazına göre daha yüksek olduğu ve sağlıklı hayvanlara yakın değerler gösterebileceği belirlendi. Bu bağlamda rutin klinik değerlendirmeler esnasında şüpheli vakaların klasik mikrohematokrit ölçümlerinden yararlanılarak değerlendirmeye alınmasının daha uygun olabileceği kanısına varıldı.

## KAYNAKLAR

- Anonim.** <http://www.beckman.com/products/instrument/partchar/technology/coulterprinciple.asp>. Erişim tarihi: 30.10.2017.
- Bamberg R, Gwyn T, Miller J, Thompson M, Transou P.** The effects of over-anticoagulated blood on hematocrit values by the microcentrifuge method. *Clin Lab Sci*, 2008; 21(3), 146.
- Brian SB, Karen LH.** Is the Packed Cell Volume (PCV) Reliable? *Lab Hematol*. 2001; 7: 191-196.
- Bull BS, Fujimoto K, Houwen B, Klee G, van Hove L, Van Assendelft OW, Lewis SM.** International Council for Standardization in Haematology (ICSH) Recommendations for "Surrogate Reference" Method for the Packed Cell Volume. *Lab Hematol*. 2003; 9: 1-9.
- Bull BS, Koepke JA, Simson E.** Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Hematocrit Method. 3<sup>th</sup> Ed., . NCCLS publication H7-A3. Wayne, Pennsylvania, NCCLS, 2000.
- CLSI.** Procedure for Determining Packed Cell Volume by the Microhematocrit Method; Approved Standard. 3<sup>rd</sup> Ed., Wayne, Pennsylvania, USA, 2000.
- Constable PD, Walker PG, Morn DE, Foreman JH.** Clinical and Laboratory Assessment of Hydration Status of Neonatal Calves with Diarrhea. *J Am Vet Med Assoc*. 1998; 212: 991-996.
- Dubin S, Piszczek J, Beard R, Schmukler R.** Effects of anticoagulants on packed cell volume measurement. *Lab Anim Sci*. 1976; 26: 586-591.
- El-sheikh AKR, Hayam M, Morsy S, Tarek H, Abbas A, Wafaa M.** Clinical and laboratory examinations of diarrhea and dehydration in newborn Friesian calves with special reference to therapy with hypertonic and isotonic solution. *Life Sci J* 2012; 9(4)
- Gebretsadkan TK, Ambachew G, Birhaneselassie H.** The Comparison Between Microhematocrit and Automated Methods for Hematocrit Determination. *Int J Blood Res Disord*. 2015; 2(1): 1-3.
- Hartmann H, Reder S.** Effect of Dehydration on Functional Indicators of Fluid Metabolism in Calves and the Efficacy of Rehydration with Crystalline or Colloidal Saline Infusions. *Tierarztl Prax*. 1995; 23: 342-350.
- Kathleen K.** The Clinical Laboratory Improvement Act (CLIA) and the Physician's Office Laboratory. *Continuing Medical Education*. 2007.
- Kronenberg F, Trenkwalder E, Kronenberg MF, König P, Utermann G, Dieplinger H.** Influence of Hematocrit on the Measurement of Lipoproteins Demonstrated by the Example of Lipoprotein. *Kidney Int*. 1998; 54(4): 1385-1389.
- Linné JJ, Ringsrud KM.** Principles and Practice of Clinical Hematology, In: *Clinical Laboratory Science, the Basics and Routine Techniques*, Ed; Turgeon ML, 4<sup>th</sup> Ed., St. Louis, Missouri, Mosby, 1999; pp. 279-295.
- McMahon DJ, Carpenter RL.** A Comparison of Conductivity-based Hematocrit Determinations with conventional Laboratory Methods in Autologous Blood Transfusions. *Anesth Analg*. 1990; 71(5): 541-544.
- Mock T, Morrison D, Yatscoff R.** Evaluation of the i-STAT<sup>TM</sup> System: A Portable Chemistry Analyzer for the Measurement of Sodium, Potassium, Chloride, Urea, Glucose, and Hematocrit. *Clin Biochem*. 1995; 28(2): 187-192.
- Peiró JR, Borges AS, Gonçalves RC, Mendes L.** Evaluation of a portable clinical analyzer for the determination of blood gas partial pressures, electrolyte concentrations, and hematocrit in venous blood samples collected from cattle, horses, and sheep. *Am J Vet Res*. 2010; 71(5): 515-521.
- Pennock C, Jones K.** Effect of ethylene-diamine-tetra-acetic (dipotassium salt) and heparin on the estimation of packed cell volume. *J Clin Pathol*. 1966; 19: 196-199.
- Prihirunkit K, Lekcharoensuk C, Pisetpaisan K.** Comparison between manual and automated methods for determination of canine and feline hematocrit and hemoglobin concentration. *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 2008; 42(4): 655-659.
- Rao LV, Jakubiak F, Sidwell JS, Winkelman JW, Snyder ML.** Accuracy evaluation of a new glucometer with automated hematocrit measurement and correction. *Clin Chim Acta*. 2005; 356(1): 178-183.
- Slanina L.** Stoffwechselüberwachung in Kaelbernbestaende, In: *Innere Krankheiten der Haustiere*, Ed; Rossow N, Horvath Z,



Bd II: Funktionelle Störungen, G. Fischer, 1998; pp. 536-544.

**Smith GW, Berchtold J.** Fluid Therapy in Calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2014;30(2):409-427

**Stott RAW, Hortin GL, Wilhite TR, Miller SB, Smith CH, Landt M.** Analytical Artifacts in Hematocrit Measurements by Whole-blood Chemistry Analyzers. *Clin Chem.* 1995; 41(2): 306-311.

**Şen İ, Constable PD.** General overview to treatment of strong ion (metabolic) acidosis in neonatal calves with diarrhea. *Eurasian J Vet Sci,* 2013; 29(3): 114-120.

## Estimation of Volume of Ox Brain And Gray and White Matter with Cavalier's Principle

Durmuş BOLAT\*

*Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Kampus, Kırıkkale, Turkey*

\*Corresponding author e-mail: bolatdurmus@yahoo.com

### ABSTRACT

We estimated the volume values, ratios, and the relationship between brain weight and volumetric values of gray and white matter of the ox brain. Six fresh brains of Holstein-Friesian strain healthy ox (17-20 months old) were used. Fresh weights of the brains were measured using digital weighing. Brains were fixed by immersion method in 10% formalin solution for 3 weeks before measurements of gray and white matter volumes using Cavalieri's principle. The brains were serially cut using a salami slicer machine (Elta GmbH, Roedermark, Germany) with a mean thickness of 8.25 mm from rostral to caudal end and averages of 11 sections were obtained from the brains. The brain volume was  $348.00 \pm 50.48 \text{ cm}^3$ ,  $175.70 \pm 11.11 \text{ cm}^3$  in gray matter volume and  $172.30 \pm 42.90 \text{ cm}^3$  in white matter volume. Volume ratios of gray and white matter were 50.98% and 49.02% respectively. The ratio of brain weight to brain volume was 1. The ratio of gray and white matter in the brain of the ox is similar to that of the gray and white matter in the human brain, but that the sheep and horse are different.

**Keywords:** point counting method, brain volume, weight volume ratio, morphometry, stereology

**Sığırlarda Beyin, Ak Madde ve Gri Maddenin Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesaplamaları**

### ÖZ

Bu çalışmada sığır beynindeki gri ve beyaz maddenin hacim değerlerini, oranları ve beyin ağırlığı ile volumetrik değerleri arasındaki ilişkiyi hesapladık. Holstein-Friesian ırklı sağlıklı sığır ağırlığı (17-20 aylık) altı taze beyin kullanıldı. Beynin taze ağırlığı dijital tartım kullanılarak ölçüldü. Cavalieri ilkesini kullanarak gri ve beyaz madde hacimlerinin ölçümünden önce beyinler daldırma yöntemi ile % 10 formalin solüsyonunda 3 hafta tespit edildi. Beyinler rostral'den kaudal'e doğru salam dilimleme makinesi (Elta GmbH, Roedermark, Almanya) ile ortalama 8.25 mm kalınlıkta seri olarak kesildi ve beyinlerden ortalama 11 kesit elde edildi. Beyin hacmi  $348.00 \pm 50.48 \text{ cm}^3$ , gri madde hacmi  $175.70 \pm 11.11 \text{ cm}^3$  ve beyaz madde hacmi  $172.30 \pm 42.90 \text{ cm}^3$  idi. Gri ve beyaz maddenin hacim oranları sırasıyla % 50.98 ve % 49.02' dir. Beyin ağırlığının beyin hacmine oranı 1 idi. Sığır beynindeki gri ve beyaz maddenin oranı insan beynindeki gri ve beyaz cevherinkine benzer, ancak koyunlardan ve atlardan farklıdır.

**Anahtar Kelimeler:** noktalı alan metodu, beyin hacmi, ağırlık hacim oranı, morfometri, stereoloji

*To cite this article: Bolat D. Estimation of volume of ox brain and gray and white matter with Cavalier's principle. Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 30-34.*

## INTRODUCTION

The brain is the most complex organ of the body. It is the center of command that controls everything from basic functions such as information, perception, depot center, heartbeat and breathing to more complex areas such as sex drive and memory mood. The brain consists of two hemispheres connected to each other by corpus callosum (Noyan 1993). When the brain is cut, two different regions, the gray and white matter, are striking. Gray matter has nerve cells, dendrites, axon endings, unmyelinated axons and neuroglia, while white matter forms myelinated nerve extensions and is involved in nerve conduction (Wen and Chklovskii, 2005). The ratio of gray and white matter is of great importance in the search for chronic diseases affecting the central nervous system such as multiple sclerosis and schizophrenia (Sastre-Garriga et al. 2005, Fornito et al. 2009).

The general and cross-sectional anatomy of the brain has been studied in cow (Getty 1975a, Nickel et al. 1975), horse (Getty 1975a, Nickel et al. 1975), sheep (Getty 1975a), donkey (Oto and Haziroglu 2009), goat (Getty 1975a), dog (Miller 1964, Getty 1975b), pig (Getty 1975b) and cat (Getty 1975b). Imaging methods such as magnetic resonance imaging (MRI) or diffusion tensor imaging (DTI) or macroscopic (Bush and Allman, 2003) and microscopic sectioning methods are used in morphometric examinations (Bolat et al. 2012). In the literature search of information on brain volume, gray and white matter volumes and proportional values in cattle was observed to be very limited.

While an interested structure can be determined by the water immersion method, this method is not possible in complex and intertwined biological structures (Cotter et al. 1999). The Cavalieri's principle has been developed to remove this problem from the biological structures and has become a frequently used method in stereology (Bjugn et al. 1989, Bjugn and Gundersen 1993, Turgut et al. 2007, Bolat et al. 2013, Bahar et al. 2013). In this method, the structure of interest is cut at equal intervals and the volume is estimated by calculating the area of each section (Anonymous 2017). In the area of estimation, a measurement ruler is used which is named as the point counting grid and has dots located at even intervals. In this respect, the biological structure of interest and the volumes of the underlying structures forming it are estimated in an objective manner.

In the current study, it was aimed to investigate the volume of whole brain, gray and white matter in cattle by the Cavalieri's principle and the possible relationship between brain weight and volume.

## MATERIALS and METHODS

Six fresh brains of Holstein-Friesian breed healthy male animals (17-20 months old) belonging to Kırıkkale region were used. The data of animals were obtained from breeders such as age, gender and race. Animals were killed in slaughterhouse and then the crania were opened properly and the brains were removed. Fresh weights of the brains were measured using digital weighing. Brains were fixed by immersion method in 10% formolin solution for 3 weeks before measurements of gray and white matter volumes. At the end of this period, the brains were serially cut using a salami slicer machine (Elta GmbH, Roedermark, Germany) with a mean thickness of 8.25 mm from rostral to caudal end and at least 10 sections obtained from each brain. Averages of 11 sections were gained from the brains. The obtained sections were placed on a flat surface according to the section line, and photographs of all sections were taken with a digital camera (Nikon, Japan) along with the millimeter paper (Figure 1). By using the millimeter paper on the photographs, the actual measurements of the brains were introduced to the ImageJ program. With the aid of the grid function of ImageJ program, point counting grid were randomly superimposed on the sections and the points on gray and white matter were counted and averages of 3 different count results were obtained. (Figure 2). The distance between the two points on the grid was determined to be 2.18 mm (Figure 2) in order to reach a reliable coefficient of error value (CE) (Gundersen 1999). In point counting grid, an average of 220 points for each animal's brains, 107 for the gray matter and 105 for the white matter were counted. The volumes are estimated as  $V = t \times a(p) \times \Sigma p$  formula. In this formula,  $V$  is the volume of the structure concerned,  $t$  is the section thickness,  $a(p)$  is the area of the one point on the grid, and  $\Sigma p$  is the sum of the points on the structure of interest. The ratio of brain weight to brain volume was determined using the brain weight / brain volume formula.

### Statistical Analysis

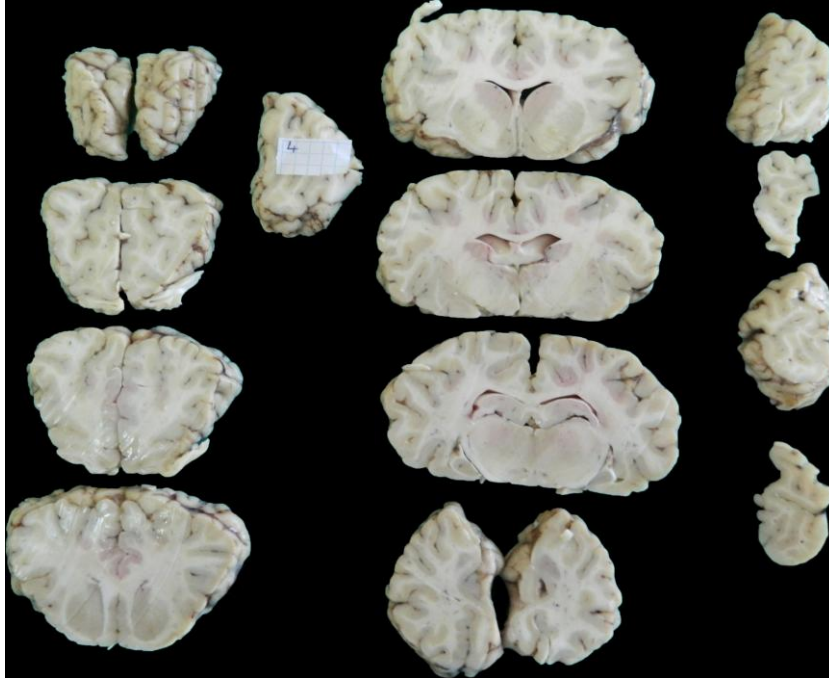
Descriptive statistic was performed using GraphPad Prism version 6.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

## RESULTS

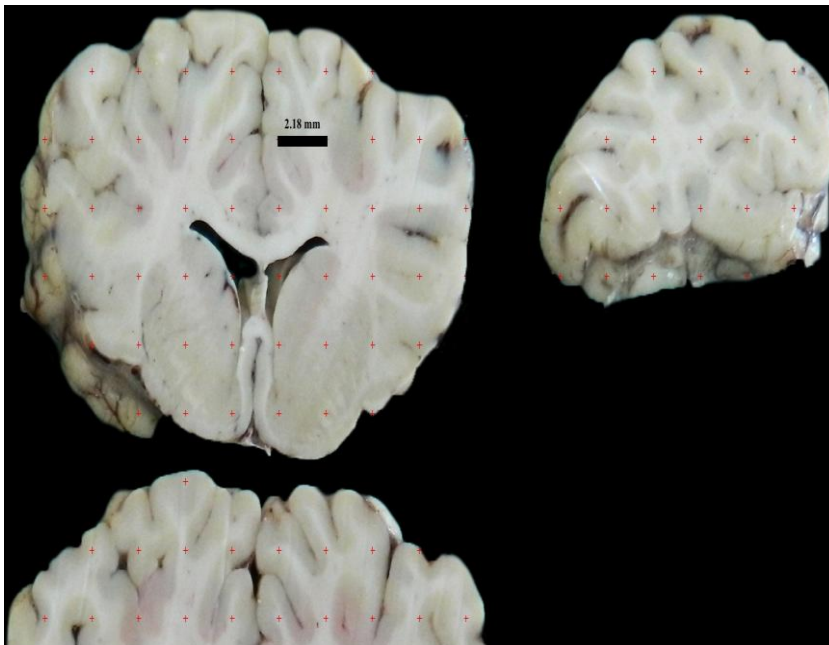
The weight data of the brains used in the study and the gray and white matter volumes determined using the Cavalieri's principle and all the brain volume ratios of these values are given in Table 1.

As a result of the estimation made, it was determined that brain volume of group consisted of 17-20 months old was  $348.00 \pm 50.48 \text{ cm}^3$ ,  $175.70 \pm 11.11 \text{ cm}^3$  in gray matter volume and  $172.30 \pm 42.90 \text{ cm}^3$  in white matter volume (Table 1). When the ratio of the gray matter and white matter volumes to the whole brain volume is

determined, it was seen that these ratios are 50.98% and 49.02% respectively. There was a 1: 1 ratio between gray matter and white matter contained in the brain. The ratio of brain weight to brain volume is 1. 1 gr. brain tissue was found to be equal to the volume of  $1.01 \text{ cm}^3$ .



**Figure 1:** The view of obtained serial sections of the brain.



**Figure 2:** Application of point counting grid on serial sections.

**Table 1.** Morphometric data of the brains used in the study.  
**Tablo 1.** Çalışmada kullanılan beyinlere ait morfolometrik veriler.

Animal no, age (month)wei ght (kg)	Brain weight (gr)	Brain volume (cm <sup>3</sup> )	Gray matter volume (cm <sup>3</sup> )	White matter volume (cm <sup>3</sup> )	Gray matter ratio (%)	White matter ratio (%)	CE value	
							Gray matter	White matter
1, 18, 440	360	318.96	181.34	137.62	56.85	43.15	0.06	0.05
2, 17, 420	325	316.25	162.36	153.90	51.34	48.66	0.07	0.06
3, 17, 415	296	330.92	164.61	166.31	49.74	50.26	0.06	0.04
4, 18, 430	330	337.47	179.88	157.59	53.30	46.70	0.04	0.05
5, 20, 505	395	449.56	191.96	257.59	42.70	57.30	0.03	0.04
6, 18, 435	350	334.88	174.07	160.81	51.98	48.02	0.04	0.06
Mean (± SD)	342,7± 33,89	348,0± 50,48	175,7± 11,11	172,3± 42,90	53,42± 3,06	50,99± 4,713	49,02± 4,713	0,050± 0,009
CV	0.099	0.140	0.063	0.249	0.092	0.096		

## DISCUSSION

Brain volume and gray and white matter volumes in the brain are used in the diagnosis and follow-up of diseases such as schizophrenia and multiple sclerosis in human medicine (Sastre-Garriga et al. 2005, Fornito et al. 2009). In studies conducted on domestic mammals, the volume of the sheep brain was determined to be  $37.74 \pm 0.78 \text{ cm}^3$ , the gray matter volume was  $28.78 \pm 0.55 \text{ cm}^3$ , and the volume of white matter in male sheep was  $10.25 \pm 0.52 \text{ cm}^3$  (Sahin et al. 2001). In the study performed on horse, it was determined that gray matter was  $184.7 \text{ cm}^3$ , white matter was  $168.6 \text{ cm}^3$  and total brain volume was  $363.2 \text{ cm}^3$  (Bahar and Dayan 2014). Mayhew and colleagues reported that the weight of ox brain was 248.8 gr. and volume of the ox brain was  $235.5 \text{ cm}^3$  (Mayhew et al. 1990). In this study, brain weight of ox was  $342,7 \pm 33,89$  and brain volume of ox was determined as  $348.00 \pm 50.48 \text{ cm}^3$ , gray matter volume was  $175.70 \pm 11.11 \text{ cm}^3$  and white matter volume was  $172.30 \pm 42.90 \text{ cm}^3$ . There is a difference between the results of Mayhew et al. (1990) and our results. It is thought that this difference may be caused by strain difference. It was determined that the ox brain and the horse brain showed similar features as volume and gray / white matter ratio. However, when gray and white matter levels are observed, which are about 10 times larger than the volume of the sheep brain, it is seen that both values are close to each other, unlike sheep. In the study conducted in the human, it is stated that the volume ratios of gray and white matter are close to each other when the

transmission routes of cerebrospinal fluid are taken into account (Taki et al. 2011). In the light of these results, it is necessary to investigate the gray and white matter content of mammals, especially the carnivorous and herbivorous brains, and whether their feeding habits have any effect on this.

**Conclusions:** The ratio of gray and white matter in the brain of the ox is similar to that of the gray and white matter in the human brain, but that the sheep and horse are different. The results of this study could shed light on future morphometric studies on gender and aging in the ox brain and the findings are also thought to be the basis of imaging techniques such as Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Computed Tomography (CT).

## Acknowledgements

The author thanked Lügen Orgun for her kindly help.

## REFERENCES

- Anonymous2017.** <http://www.stereology.info/cavalieri-estimator/>; Accession date: 11.10.2017.
- Bjugn R, Boe R, Haugland HK.** A stereological study of the ependyma of the mouse spinal cord with a comparative note on the choroid plexus ependyma. *J Anat.* 1989; 166: 171-178.
- Bjugn R, Gundersen HJ.** Estimate of the total number of neurons and glial and endothelial cells in the rat spinal cord by means of the

- optical disector. *J Comp Neurol.* 1993; 328: 406-414.
- Bolat D, Bahar S, Selcuk M, Tipirdamaz S.** Morphometric investigations fresh and fixed rabbit kidney, *Eurasian J Vet Sci.* 2011; 27: 149-54.
- Bolat D, Bahar S, Sur E, Selcuk M, Tipirdamaz S.** Selective gray and white matter staining of the horse spinal cord, *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2012; 18: 249-54.
- Bolat D, Bahar S, Tipirdamaz S, Selcuk M.** Comparison of the morphometric features of the left and right Horse kidneys: A stereological approach, *Anat Histol Embryol.* 2013; Doi: 10.1111/ahe.12036.
- Bush EC, Allman JM.** The scaling of white matter to gray matter in cerebellum and neocortex, *Brain Behav Evol.* 2003; 61: 1-5.
- Cotter D, Miszkiel K, Al-Sarraj S, Wilkinson ID, Paley M, Harrison MJ, Hall-Craggs MA, Everall IP.** The assessment of postmortem brain volume; a comparison of stereological and planimetric methodologies, *Neuroradiology.* 1999; 41: 493-6.
- Fornito A, Yucel M, Patti J, Wood SJ, Pantelis C.** Mapping grey matter reductions in schizophrenia: an anatomical likelihood estimation analysis of voxel-based morphometry studies, *Schizophr Res.* 2009; 108; 104-13.
- Getty R.** 1975a. *Sissons and Grossmann's The Anatomy of the Domestic Animals*, 5th edition, volume 1, Philadelphia, W.B. Saunders Company, USA, pp: 633-650.
- Getty R.** 1975b *Sissons and Grossmann's The Anatomy of the Domestic Animals*, 5th edition, volume 2, Philadelphia, W.B. Saunders Company, USA, pp: 1671-1686.
- Mayhew TM, Mwamengele GL, Dantzer V.** Comparative morphometry of the mammalian brain: estimates of cerebral volumes and cortical surface areas obtained from macroscopic slices. *J Anat.* 1990; 172: 191-200.
- Miller ME.** 1964. *Anatomy of The Dog*, 3<sup>th</sup>. edition, Philadelphia, Saunders Company, USA.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E.** 1975. *Lehrbuch Der Anatomie Der Haustiere.* Band IV. Verlag Paul Parey, Berlin, Germany.
- Noyan A.** 1993, *Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji*, 8<sup>th</sup>. edition, Meteksan.
- Oto C, Hazirolu RM.** Macro-anatomical investigation of encephalon in donkey. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2009; 56: 159-164.
- Sahin B, Aslan H, Unal B, Canan S, Bilgic S, Kaplan S, Tumkaya L.** Brain volumes of the lamb, rat and bird do not show hemispheric asymmetry: a stereological study, *Image Anal Stereol.* 2001; 20: 9-13.
- Sastre-Garriga J, Ingle GT, Chard DT, Cercignani M, Ramio-Torrenta L, Miller DH, Thompson AJ.** Grey and white matter volume changes in early primary progressive multiple sclerosis: a longitudinal study, *Brain.* 2005; 128: 1454-60.
- Taki Y, Thyreau B, Kinomura S, Sato K, Goto R, Kawashima R, Fukuda H.** Correlations among brain gray matter volumes, age, gender, and hemisphere in healthy individuals, *PLoS One* 2011; Doi: 10.1371/journal.pone.0022734.
- Wen Q, Chklovskii DB.** Segregation of the brain into gray and white matter: a design minimizing conduction delays, *PLoS Comput Biol.* 2005; Doi: 10.1371/journal.pcbi.0010078.

## The Effects of Liquid Dishwashing Detergent Exposure in Male Swiss Albino Mice

Özlem YILDIZ GÜLAY<sup>1</sup>, Ayhan ATA<sup>2</sup>, Ahu DEMİRTAŞ<sup>1</sup>, Şükrü GÜNGÖR<sup>2</sup>,  
Mehmet Şükrü GÜLAY<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Budur, Turkey

<sup>2</sup>Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Budur, Turkey

\*Corresponding author e-mail: msgulay@mehmetakif.edu.tr

### ABSTRACT

The current study investigated the possible effects of liquid dishwashing detergent on some blood parameters and organ weights of male Swiss Albino mice. A total of 40 male Swiss albino mice were used in the experiment. Mice were randomly assigned to 5 treatment groups (n=8 per group). Mice in the control group (TR1) were supplied with tap water. Meanwhile, mice in TR2, TR3, TR4 and TR5 groups were given 0.1, 0.5, 1 and 5% v/v of the liquid detergent in tap water, respectively. The treatments started at 3 wk of age and continued for 60 d. Mice were kept under standard laboratory conditions in separate plastic cages. Food and water were provided ad libitum. At the end of the 60 d treatment period, blood samples were collected from the beating hearth under anesthesia. After sacrificed, the organs of the mice were weighted. There were no significant alterations on hematocrit, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, total lymphocyte, monocyte or basophil levels (P>0.1) due to detergent exposure. Similarly, treatments had no effect on liver, kidney, spleen, lung, testis or brain weights (P>0.1). However, ingestion of detergent adversely affected hemoglobin (P < 0.01), plasma protein (P<0.05), total neutrophil (P<0.03) and eosinophil (P<0.03) levels. Furthermore, ALP and AST levels were significantly increased in TR4 and TR5 (P<0.05) due to detergent exposure. Thus, the results of the current study imply that particularly the higher doses of liquid dishwashing detergent could be toxic and cause health risks to male Swiss albino mice.

**Keywords:** detergent, toxicity, hematology, liver enzymes

### Swiss Albino Erkek Farelerde Sıvı Bulaşık Deterjanı Maruziyetinin Etkilerinin İncelenmesi

#### ÖZ

Bu çalışmanın amacı sıvı bulaşık deterjanının erkek Swiss Albino farelerinde kan parametreleri ve organ ağırlıkları üzerine etkisinin araştırılmasıdır. Bu amaçla 40 sağlıklı Swiss albino fare rastgele olarak, her grupta 8 fare olacak şekilde, toplam 5 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki farelere (TR1) içme suyu olarak sadece musluk suyu verilirken, TR2, TR3, TR4 ve TR5 grubunda bulunan farelere su kaynağı olarak sırasıyla sadece 0.1, 0.5, 1 ve 5% sıvı deterjan ihtiva eden musluk suyu verildi. Çalışma fareler 3 haftalıkken başladı ve 60 gün süresince devam etti. Fareler standard laboratuvar koşulları altında plastik kafeslerde muhafaza edildi. Besin ve su ad libitum olarak sağlandı. Uygulamanın sonunda farelerden Sevorane anestezisi altında kan örnekleri toplandı. Kan örnekleri toplandıktan sonra hayvanlar öldürülerek iç organları çıkarıldı ve tartıldı. Bu çalışmanın sonucuna göre uygulanan deterjan dozlarının hematokrit, alyuvar, akyuvar, ortalama alyuvar hacmi, ortalama alyuvar hemoglobini, ortalama alyuvar hemoglobin yoğunluğu, total lenfosit, monosit ve bazofil değerleri üzerine herhangi bir etkisine rastlanmadı (P>0.1). Ayrıca, deterjan uygulamasının karaciğer, böbrek, dalak, akciğer, testis ve beyin ağırlıkları üzerinde etkisinin olmadığı belirlendi (P>0.1). Ancak, hemoglobin(P<0.01), plazma protein (P<0.05), total nötrofil (P<0.03) ve eozinofil (P<0.03) seviyelerinin deterjan uygulamasından olumsuz etkilendiği gözlemlendi. Bununla birlikte, ALP ve AST seviyeleri TR4 ve TR5 gruplarında önemli bir şekilde yüksek bulundu (P<0.05). Bu çalışmadan elde edilen veriler ışığında, özellikle yüksek dozlarda deterjan uygulamasının erkek Swiss albino farelerde toksik etki yapabileceği ve sağlık problemlerine yol açabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar kelimeler:** deterjan, toksisite, hematoloji, karaciğer enzimleri

To cite this article: Gülay O.Y Ata A. Demirtaş A. Güngör Ş. Gülay M. Ş The Effects of Liquid Dishwashing Detergent Exposure in Male Swiss Albino Mice. *Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 35-39.*

## INTRODUCTION

Detergents are designed for cleaning purposes. They are often used for assisting the removal of dirt or other materials from contaminated surfaces. The active chemical ingredients of detergents are termed as surfactants or surface-active agents (Scott and Jones, 2000; Yahaya et al. 2011). Thus, they are called as amphiphilic substances because one part of the detergent is hydrophilic and the other part is hydrophobic. In general practice, classic anionic "detergent" refers to alkylbenzenesulfonates. The alkylbenzene part of these detergents is lipophilic and the sulfonate part is hydrophilic (Prats et al. 1997).

Two varieties of detergents have been popular: branched alkyl groups and linear alkyl groups. Today, mostly detergents with branched alkyl groups are in use since detergents with linear alkyl groups are poorly biodegradable. The total quantity of linear alkylbenzene sulphonates (LAS) were around 1million ton/year in the United States, Japan and Western Europe (Ritchler and Knaut, 1991). The surfactant production in Western Europe was estimated to be around 3 million tons in 2010 (CESIO-Stats 2010).

Detergents are commonly used in two major markets, household detergents and industrial/institutional cleaning products. In addition, they are being used for pesticide formulations. However, household detergents are the major source of chemical substances of domestic origin which are discharged into the environment. Both industrial and domestic premises consume more than 1.2 million tons surfactants in Europe (Morse 1999). As a result, the increasing domestic health hazards and environmental pollution are arising from detergent exposure (Warne and Schiffko, 1999).

The detergent exposure can pose serious health risks to human and animals. However, the effects of detergent exposure on mammalian health are poorly studied. Thus, the aim of the current study was to investigate the toxicity of liquid dishwashing detergent on some blood parameters and organ weights of male Swiss Albino mice.

## MATERIALS and METHODS

### Animals and Diets

The study was approved by the ethics committee of Suleyman Demirel University (08/12/2009.28.05) Total of 40 healthy male Swiss albino mice were used. The mice were kept in plastic cages, under standard laboratory conditions (12 h light/dark and 22°C). Pelletized commercial feeds were given ad libitum (Korkuteli Yem, Antalya, Turkiye; 88% dry

matter, 8%ash, 23% crude protein, 5% crude fiber). All treatments started right after weaning (3-weeks of age) and continued for 60 days.

### Experiment and Sampling

A commonly used dish washing liquid was purchased from local market and used in the current experiment. The chemical constituents of the detergent included anionic and nonionic surfactants, ethanol and ethanolamine. Initial weights of the mice were taken and the animals randomly assigned into 5 different treatment groups (n=8 per group). The control mice (TR1) were resigned in cage 1 and received tap water. The treated mice in cages 2, 3, 4 and 5 were given 0.1 (TR2), 0.5 (TR3), 1 (TR4) and 5 (TR5) % v/v of the liquid detergent solutions in tap water, respectively as the only source of water. Water intake was checked and noted daily in all treatment groups.

At the end of the experiment, mice were kept under sevorane anesthesia and body weights were recorded. Each mouse was cut through the chest region in a dorsal-ventral direction and blood samples were collected into Na-heparinized capillary tube from the beating hearth. After blood collection, animals were sacrificed and internal organs were removed. The weights of the organs were recorded.

### Blood Parameters

Plasma protein levels were measured by using hand-held refractometer (Atago, SPR-N, Japan) at 22°C by the same person. Hemoglobin was measured spectrophotometrically by using the cyanmethemoglobin method (Bhaskaram et al. 2003). Microhematocrit method was used for the hematocrit measurements (Chernecky and Berger, 2001).

For counting red blood cell (RBC), the blood was diluted 200 times with the Hayem solution. For counting white blood cells (WBC), the blood was diluted 10 times with the Turck's solution. Subsequently, dilutions were counted in the Thoma counter compartment at 40X magnification (Nageswari and Kothari, 2007).

Mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), and mean corpuscular hemoglobin concentrations (MCHC) were calculated by the help of total erythrocytes, hematocrit, and hemoglobin values (Chernecky and Berger, 2001). Percent leukocyte distribution were determined from the blood smears that were stained with May Grünwald–Giemsa stain.

Alkaline phosphatase (ALP) and aspartate aminotransferase (AST) concentrations were measured by auto analyzer (Gesam Chem 200).



### Statistical Analyses

Results are presented as mean  $\pm$  SE. Data were analyzed by one way ANOVA and Tukey post hoc tests. All statistical analyses were carried out using SAS statistical package. The minimum level of significance was set at  $p < 0.05$ .

### RESULTS

The mice in the current study showed no clinical signs of toxicity. The water consumption among the groups did not differ (TR1 =  $5.61 \pm 1.29$ , TR2 =  $6.27 \pm 1.15$ , TR3 =  $6.44 \pm 1.46$ , TR4 =  $6.17 \pm 1.59$  and TR5 =  $6.31 \pm 1.40$  ml/day/mouse,  $P > 0.1$ ). No changes in hematocrit, RBC, WBC, MCV, MCH, MCHC, total lymphocytes,

monocytes, or basophils were apparent among the treatments ( $P > 0.1$ ; Tables 1 and 2). Moreover, the weights of liver, kidney, spleen, lung, testis and brain were not altered due to detergent exposure ( $P > 0.1$ ; Table 3). On the other hand, the results of the hematologic examination indicated a marked reduction on total hemoglobin ( $P < 0.01$ ) and plasma protein ( $P < 0.05$ ) levels due to detergent treatment (Tables 1 and 2). Detergent treatments also resulted in increased total neutrophil ( $P < 0.03$ ) and total eosinophil ( $P < 0.03$ ) levels. In addition, serum ALP and AST levels were significantly elevated in TR4 and TR5 ( $P < 0.05$ ; Tables 1 and 2).

**Table 1.** Effect of liquid dishwashing detergent on plasma protein levels, and some hematological and biochemical parameters of Swiss Albino mice after oral gavages for 60 days.

	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	P <
Plasma Protein (g/dL)	$6.88 \pm 0.26^a$	$6.52 \pm 0.13^a$	$6.71 \pm 0.27^a$	$5.98 \pm 0.11^b$	$6.08 \pm 0.31^b$	0.05
RBC ( $\times 10^6$ )	$9.56 \pm 0.72$	$8.73 \pm 0.29$	$8.66 \pm 0.26$	$8.50 \pm 0.19$	$8.32 \pm 0.25$	NS
Hemoglobin (g/dL)	$15.2 \pm 0.39^a$	$14.7 \pm 0.35^{ab}$	$14.4 \pm 0.56^{bc}$	$12.7 \pm 0.54^c$	$13.1 \pm 0.40^c$	0.01
Hematocrit (%)	$39.4 \pm 1.23$	$38.1 \pm 2.28$	$37.1 \pm 1.82$	$35.0 \pm 1.68$	$34.75 \pm 2.16$	NS
MCV (fL)	$42.4 \pm 2.23$	$43.3 \pm 2.43$	$43.9 \pm 3.03$	$41.2 \pm 3.21$	$42.0 \pm 2.42$	NS
MCH (pg)	$16.5 \pm 1.08$	$16.9 \pm 0.68$	$16.7 \pm 1.10$	$15.0 \pm 0.81$	$15.7 \pm 0.51$	NS
MCHC (g/dL)	$38.8 \pm 1.82$	$39.6 \pm 2.45$	$39.2 \pm 2.04$	$37.1 \pm 2.02$	$38.2 \pm 2.05$	NS
ALP (U/I)	$42.7 \pm 1.82^a$	$43.4 \pm 2.74^a$	$44.3 \pm 2.25^a$	$50.6 \pm 2.92^b$	$51.4 \pm 2.75^b$	0.05
AST (U/I)	$24.9 \pm 0.56^a$	$24.7 \pm 0.61^a$	$25.6 \pm 0.75^a$	$27.5 \pm 0.81^b$	$28.4 \pm 0.73^b$	0.05

a,b,c: Averages in groups in the same row with different superscripts are statistically important; NS= Not significant.

**Table 2.** Effect of liquid dishwashing detergent on white blood cells (WBC) of Swiss Albino mice after oral gavages for 60 days.

	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	P <
WBC ( $\times 10^3$ )	$5.06 \pm 0.43$	$5.13 \pm 0.56$	$5.38 \pm 0.23$	$6.06 \pm 0.31$	$7.33 \pm 1.62$	NS
Lymphocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$3.91 \pm 0.37$	$3.92 \pm 0.53$	$4.14 \pm 0.17$	$4.36 \pm 0.34$	$5.05 \pm 1.19$	NS
Neutrophils ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$0.83 \pm 0.08^a$	$0.78 \pm 0.13^a$	$0.91 \pm 0.05^a$	$1.04 \pm 0.10^b$	$1.68 \pm 0.41^b$	0.03
Monocytes ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$0.23 \pm 0.05$	$0.22 \pm 0.07$	$0.31 \pm 0.05$	$0.32 \pm 0.04$	$0.37 \pm 0.03$	NS
Eosinophils ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$0.071 \pm 0.01^a$	$0.096 \pm 0.02^a$	$0.082 \pm 0.03^a$	$0.272 \pm 0.09^b$	$0.263 \pm 0.08^b$	0.03
Basophils ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	$0.008 \pm 0.004$	$0.011 \pm 0.007$	$0.013 \pm 0.008$	$0.014 \pm 0.009$	$0.016 \pm 0.007$	NS

a,b: Averages in groups in the same row with different superscripts are statistically important; NS=Not significant.

**Table 3.** Effect of liquid dishwashing detergent on body and some organ weights of Swiss Albino mice after oral gavages for 60 days.

	TR1	TR2	TR3	TR4	TR5	P<
Body Weight (g)	30.5±0.51	30.3±0.52	29.1±0.42	30.3±0.50	29.2±0.41	NS
Liver (g)	1.39±0.06	1.47±0.05	1.37±0.06	1.40±0.05	1.37±0.06	NS
Right Kidney (g)	0.22±0.01	0.22±0.01	0.21±0.02	0.23±0.02	0.22±0.01	NS
Spleen (g)	0.10±0.006	0.09±0.005	0.09±0.005	0.10±0.006	0.10±0.005	NS
Lung (g)	0.20±0.01	0.20±0.01	0.19±0.02	0.18±0.01	0.18±0.01	NS
Brain (g)	0.37±0.01	0.38±0.02	0.35±0.02	0.36±0.01	0.38±0.01	NS

NS=Not significant.

## DISCUSSION

The marked changes in some of the blood parameters of detergent treated mice are supported by the previous studies. The alterations in haematological profiles due to a surfactant, sodium dodecyl sulfate, in rabbits (Wadaan and Mubarak, 2009) and an anionic detergent in Sprague Dawley rats (Dehelean et al. 2004) had been previously reported. Haematological profiles are known to provide important information about the internal environment of mammals. The environmental factors reported to pose a variety of adverse effects on the haematological profiles of most organisms. In the current study, there was a decrease in hemoglobin levels of the mice in TR4 and TR5. It is possible that the constituents in detergent might have interacted with hemoglobin synthesis. Decrease in hemoglobin synthesis could be associated with liver damage, or iron absorption from small intestine.

Similarly, total neutrophils and eosinophils were increased only within the two highest dose detergent treatment groups. This could be a result of immune and allergic response to the toxic components of the detergent. The increased neutrophil production indicates a stimulation of the immune system which protects the mice against infection that might have been caused by chemical and also secondary infections. This may be directly proportional to the severity of the causative stress condition, may be attributed to an increase in neutrophil mobilization.

Although there were no previous findings for the effect of detergents on liver enzymes, there were limited reports on the tissue and organ damages. Ayandiran et al. (2009) previously

reported histopathological changes in muscle tissues of detergent exposed catfish. Ogundiran et al (2010) also reported a multi-organ damages due to detergent exposure in catfish. Similarly, heart, lung and liver damage was apparent in mice treated with detergent solutions (Yahaya et al. 2011). Biochemical markers such as ALP and AST are often used as basis for the assessment of toxicity of an organ. An increase in ALP levels is usually a sign of non-specific tissue irritation and usually implies a toxic effect on the liver with bile duct alterations. The liver, kidney, heart, brain, and skeletal muscle tissues are the major sources for AST. Accordingly, a raise in AST activity may possibly be the result of liver, heart or muscle damage. Therefore, higher blood concentrations of ALP and AST in treated mice suggest liver damage, as was paralleled with decreased plasma protein levels.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our results suggested that especially the higher doses used in the current study could be toxic and cause health risks to mice. It will be worth investigating further as to if the parameters studied herein returned to baseline, upon the discontinuation of detergent exposure.

## REFERENCES

- Ayandiran TA, Fawole SO, Adewoye SO, Ogundiran MA. Bio-concentration of metals in the body muscle and gut of *Clarias gariepinus* exposed to sub-lethal concentrations of soap and detergent effluent. *J Cell Anim Biol.* 2009; 3:113-118.

- Bhaskaram P, Balakrishna N, Radhakrishna KV, Krishnaswamy K.** Validation of hemoglobin estimation using Hemocue. *Ind J Pediatrics*. 2003; 70(1): 25-28.
- CESIO-Stats2010-Summary.** <http://www.cefic.org/Documents/About%20us/Industry%20sectors/CESIO/CESIO-Stats2010-Summary-CD Hager.pdf>; Accession date: 21.06.2015.
- Chernecky CC, Berger BJ.** *Laboratory Tests and Diagnostic Procedures*. 3rd ed, W. B. Saunders Company, Philadelphia, 2001.
- Dehelean C, Nastase A, Dragomirescu A, Heges A, Dinte E.** Skin toxicity of sodium lauryl sulfate as evidenced in an animal model. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*. 2004; 108:169-172.
- Morse PM.** Soaps and detergents. *Chemical and Engineering News*, February 1, 1999.
- Nageswari KS, Kothari A.** *Practical Manual of Haematology*. Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd., New Delhi, India, 2007; pp. 93-111.
- Ogundiran MA, Fawole OO, Adewoye SO, Ayandiran TA.** Toxicological impacts of detergent effluent on juvenile of African Catfish (*Claris gariepinus* B.). *Agric Bio Am*. 2010; 1: 330-342.
- Prats D, Ruiz F, Vazquez B, Rodriguez-Pastor M.** Removal of anionic and nonionic surfactants in a wastewater treatment plant with anaerobic digestion: a comparative study. *Water Res*. 1997; 31(8):1925-1930
- Richtler HJ, Knaut J.** Surfactants in the nineties. *J Com Esp Deterg*. 1991; 22: 3-53.
- Scott MJ, Jones MN.** The biodegradation of surfactants in the environment. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1508:235-251
- Wadaan MAM, Mubarak M.** Toxicity of laundry detergent components to a freshwater cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicol Environ Safety*. 2009; 44:196-206.
- Warne MJSt, Schifko AD.** Toxicity of laundry detergent components to a freshwater Cladoceran and their contribution to detergent toxicity. *Ecotoxicol Environ Safety*. 1999; 44:196-206.
- Yahaya T, Okpuzor J, Oladele EO.** Investigation of toxicity of detergents. *J Environ Sci Technol*. 2011; 4: 638-645.

## Investigating The Usage of Molted Feather Samples as a DNA Source with Two Methods in Gender Identification of African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*) by Molecular Analyses of CHDW and CHDZ Genes<sup>#</sup>

Kozet AVANUS<sup>1\*</sup>, Lora KOENHEMSI<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, Istanbul University, Istanbul, Turkey.

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

# This study was supported as a research project (VET-ZH-16-8) by Istanbul University Deanery of Faculty of Veterinary Medicine.

\*Corresponding author e-mail: avanus@istanbul.edu.tr

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficiency of two methods (method 1 and 2) for DNA isolation from molted feathers that were used in gender identification of African grey parrots (*Psittacus erithacus*). The molted feathers of twelve parrots were stored up to three months, two were contaminated with feces, further eight were stored up to five months; one was contaminated with feces totally feather samples of twenty parrots were used. Genomic DNA was isolated with method 1 successfully from the molted feathers of ten parrots that were stored for up to three months and free from feces. The differentiation of the gender that was made by amplification of chromo helicase-binding domain genes (CHDW and CHDZ), was resulted with two females and eight males. However no genomic DNAs were obtained from the feathers contaminated with feces or were stored up to five months with method 1 and none of the samples that were processed with method 2. Feces contamination and freshness of molted feathers affect the gender identification. In conclusion method 1 can be used in DNA isolation in order to perform gender identification from clean and fresh molted feathers in African grey parrots.

**Keywords:** Gender, African grey, parrot, molted feather, CHD.

**Afrika Gri Papağanlarına (*Psittacus erithacus*) Ait Dökülmüş Tüy Örneklerinin İki Yöntem ile DNA Kaynağı Olarak CHDW ve CHDZ Genlerinin Moleküler Analizi ile Cinsiyet Tanımlamasında Kullanımının Araştırılması**

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı Afrika gri papağanlarında (*Psittacus erithacus*) cinsiyet tayininde kullanmak üzere dökülmüş tüylerden DNA izolasyonunda iki metodun (metot 1 ve metot 2) etkinliğinin değerlendirilmesidir. Oniki tanesi üç aya kadar saklanmış; iki tanesi dışkıyla kontamine, ayrıca sekiz tanesi beş aya kadar saklanmış; biri dışkıyla kontamine olmak üzere toplam yirmi papağana ait dökülmüş tüy örnekleri kullanılmıştır. Üç aya kadar saklanmış ve dışkıdan arı on adet dökülmüş tüyden metot 1 ile genomik DNA başarı ile elde edilmiştir. Cinsiyet ayırımı kromo helikaz-bağlanma bölgesi genlerinin (CHDW ve CHDZ) çoğaltılması ile iki dişi sekiz erkek olarak sonuçlanmıştır. Ancak genomik DNA metot 1 ile dışkı ile kontamine olmuş tüyler ile birlikte beş aya kadar saklanmış olan tüylerin hiçbirinden, ayrıca metot 2 ile tüy örneklerinin tamamından elde edilememiştir. Dökülmüş tüylerin dışkı ile kontaminasyonu ve tazeliği cinsiyet tayininin başarısını etkilemektedir. Sonuç olarak metot 1, Afrika gri papağanlarında temiz ve taze dökülmüş tüylerden DNA izolasyonu yapılarak cinsiyet tayininde kullanılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Cinsiyet, Afrika grisi, papağan, dökülmüş tüy, CHD

To cite this article: Avanus K, Koenbensi L. Investigating The Usage of Molted Feather Samples as a DNA Source with Two Methods in Gender Identification of African Grey Parrot (*Psittacus erithacus*) by Molecular Analyses of CHDW and CHDZ Genes. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(1): 40-44.

## INTRODUCTION

African grey (*Psittacus erithacus*) is one of the most popular companion parrots in Turkey. Determining the gender of avian species is generally difficult before puberty. However in monomorphic avian species it is even difficult after puberty (Cerit and Avanus 2007<sup>a</sup>). Owls, ducks, nestling turkeys, geese, and parrots are some of the monomorphic avian species that their gender identification is challenging due to their monomorphological features. This also affects wildlife conservation and breeding studies of parrots performed by scientists, breeders and owners (Griffiths et al. 1995, Griffiths et al. 1998). If breeders hesitate about the gender of the candidate parents in order to perform nestlings, their success and required time duration in obtaining newborns will be affected (Cerit and Avanus 2007<sup>b</sup>). Avian gender chromosomes Z and W are differently evolved in birds compare to mammalian gender chromosomes X and Y (Ellegren and Carmichael 2001). As opposed to in mammals, in avian species heterogametic (ZW) one is the female and homogametic (ZZ) one is the male (Handley et al. 2004). The most critical question is how two types of gender chromosomes play a role in gender identification of birds. Although W chromosome is female specific, its structure resembles to mammalian male Y chromosome. Chromo helicase DNA binding protein (CHDW) and ATP synthesis  $\alpha$ -sub unit (ATP5A1W) genes were defined on the W chromosome. The non-recombined part of the W chromosome includes these both genes and Z chromosome contains their similar homologues (CHDZ and ATP5A1Z). Intron region size varies between CHDW and CHDZ genes. Therefore it also differs between male (ZZ) and female (ZW)

birds. Differentiation of genders with molecular analyses are based on this variation (Griffiths and Tiwari 1993, Griffiths and Korn 1997, Fridolfsson and Ellegren 2000, Ellegren 2001). The aim of this study was to evaluate the usability of molted feather samples as a DNA source by two methods to perform gender identification in African grey parrot (*Psittacus erithacus*) by genetic analyses of CHDW and CHDZ genes.

## MATERIAL AND METHODS

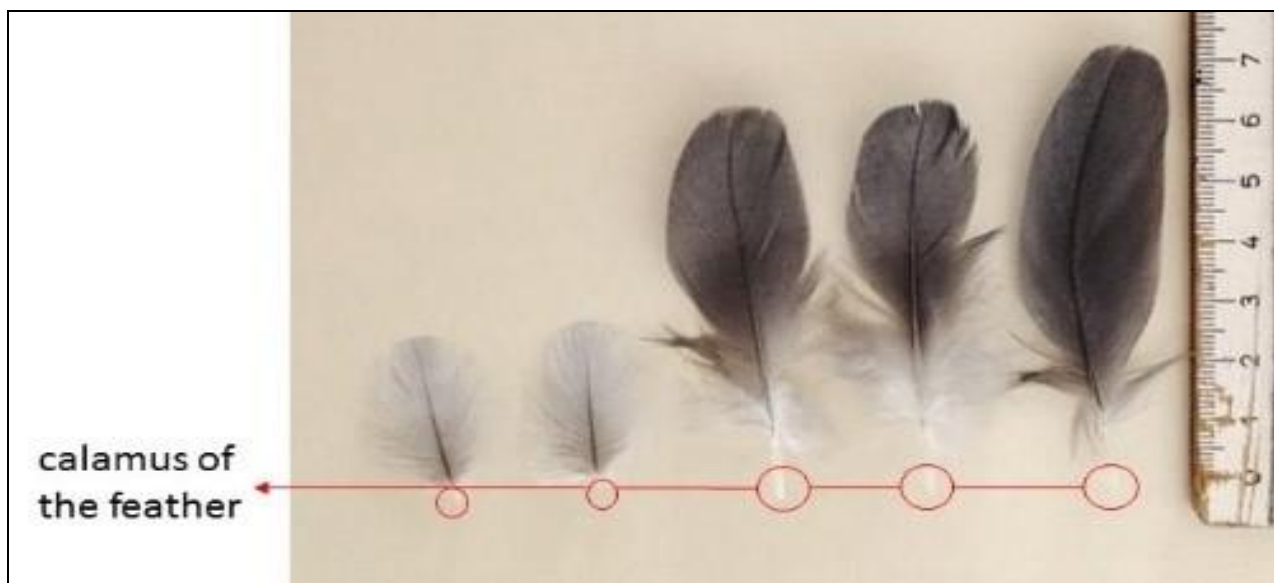
This study was conducted on molted feather samples of twenty African grey parrots. Molted feathers were collected from individual cages without giving any harm to parrots.

### Feather Samples

For each parrot, feather samples were taken from individual cages into separate clean plastic bags and stored in the dark at room temperature. The feather samples of twelve parrots were stored up to three months, two were contaminated with feces. Moreover feather samples of eight parrots were stored up for five months, one of them was contaminated with feces.

### DNA Isolation From Feather Samples

The calamus of the feathers were used as a DNA source (Figure 1). According to the size of the calamus, 3-5 feather samples were used from each parrot. The feathers were cut with sterile scalpel tips. The calamus were removed, chocked and put in to labeled 1.5 ml sterile centrifuge tubes in order to perform DNA isolation. Two methods used for DNA isolation from feather samples were named as method 1 and method 2.



**Figure 1:** The calamus of molted feather samples in an African grey parrot that were used as a DNA source.

### Method 1

The first DNA isolation method used for feather samples of twenty African grey parrots was a modified protocol of DNeasy® Blood and Tissue kit (Qiagen, Valencia, California, USA) (Bush et al. 2005). Kit suggests incubation duration for lysis until animal tissue disappears, therefore an overnight incubation was performed at 55°C in incubator in this study. Kit contains a ready to use 20 mg/ml proteinase K solution, but it was not enough for lysis procedure, therefore 25 mg/ml proteinase K was prepared. All other steps that described for animal tissues in the user manual of the kit were followed ([http://diagnostics1.com/MANUAL/General\\_Qiagen.pdf](http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf)).

### Method 2

The second DNA isolation method from the feather samples of twenty African grey parrots was a modified protocol of PureLink® Genomic DNA Kits (Invitrogen, California, USA). This kit contains a ready to use 20 mg/ml proteinase K solution. However lysis step was not successfully completed with 20 mg/ml, therefore two proteinase K solutions were prepared in different concentrations (25 mg/ml and 30 mg/ml). Incubation was performed overnight at 55°C. All other steps for animal tissues were followed as described in the kit's user manual ([https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_man.pdf)).

### Visualizing of genomic DNA

After performing DNA isolation with method 1 and method 2, all samples were load in to 0.8% agarose gel electrophoresis and genomic DNAs were visualized on UV transilluminator.

### Amplification of CHD genes

The region of the CHD genes were amplified with 2550F (5'-GTTACTGATTCGTCTACGAGA-3') and 2718R (5'-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3') primer pairs (Fridolfsson and Ellegren 1999). The PCR amplification was performed in a total volume of 25 µl consists from 5 µl Taq PCR Master Mix (200 U/ml Ultra-Pure Taq DNA Polymerase, 1.25 mM dNTPs, 10 mM MgCl<sub>2</sub>; Geneaid Biotech™, Taiwan), 0.5 µl 20 pmol of each primer, 3 µl genomic DNA (100 ng) and 16 µl dH<sub>2</sub>O (AccuGENE™, Lonza, Belgium). Amplification was performed with the following conditions; denaturing at 95°C in 4 min, 35 cycles of 95°C in 30 sec, 55°C in 30 sec, 72°C in 45 sec and final extension at 72°C in 5 min in thermal cycler machine (Bio-Rad T100, Bio-Rad Laboratories Inc., CA, USA). The PCR products were loaded into 3% agarose gel electrophoresis and they were visualized on UV transilluminator.

## RESULTS

### Method 1

Genomic DNAs were successfully isolated from feather samples of ten parrots that were stored up to three months and they were observed on 0.8% agarose gel electrophoresis. After performing the amplification of CHD genes, single (600bp) and double band (600bp and 450bp) patterns were observed on 3% agarose gel electrophoresis for male and female birds respectively. The gender of ten African grey parrot were identified as eight male and two female (Figure 2). Genomic DNA isolation with method 1 could not successfully performed not only for the feather samples of two parrots that were contaminated with feces, but also eight parrots that their feather samples were stored up to five months.



**Figure 2.** Gender identification was performed on 3% agarose gel electrophoresis. Out of ten parrots two were identified as female and eight as male from molted feather samples with using method 1. Female and male African grey parrots were observed with double (450bp and 600bp) and single (600bp) band patterns respectively (L: 100bp DNA ladder).

## Method 2

After performing DNA isolation from feather samples of twenty African grey parrots with method 2, no genomic DNA bands were observed on 0.8% agarose gel. Even so PCR amplification was applied to the samples and no amplicons were observed on 3% agarose gel electrophoresis as expected.

## DISCUSSION

The balance of the female/male ratio is important in a small population of companion parrots. If gender identification of parrots are not clear reproduction process could be longer than predicted which will also cause significant financial losses (Cerit and Avanus 2007<sup>b</sup>). However gender identification by the inspection of morphological characteristics is challenging in African grey parrots since they are one of the monomorphic avian species. Before the DNA analysis method was developed, gender of monomorphic birds was determined by laparoscopic or karyotyping methods. But birds could have been harmed or even been killed during the implementation of these methods (Trewick 1996, Heinsohn et al. 1997, Saino et al. 1999).

After developments in molecular genetics methods, gender identification in monomorphic birds was begun to analyze with DNA typing of CHDW and CHDZ gender chromosomes (Ellegren 1996). Isolation of genomic DNA for gender identification in parrots by molecular analyses of CHD genes can be performed by using various materials such as blood samples, plucked or molted feathers. Blood and plucked feathers were the most preferred materials in avian DNA isolation (Harvey et al. 2006, Bosnjak et al. 2013, Vucicevic et al. 2013, Bogovic et al. 2017). Since FTA cards could lead to a high risk of cross contamination, EDTA tubes are advisable for collecting blood samples (Suriyaphol et al. 2014). However, both collecting blood samples and plucking feathers are stressful for parrots (Harvey et al. 2006), the molted feathers could be an alternative, less stressful and painless material for obtaining genomic DNA in African grey parrots. Buccal swabs and feces can also be suggested as alternative DNA sources. Whereas collecting buccal swabs is also stressful for the bird and using feces samples does not result with enough DNA yield to perform gender identification in avian species (Bogovic et al. 2016). Consequently taking molted feather samples is easier for the researcher and more comfortable for the parrot compared to collecting blood samples, plucking feathers and taking buccal swabs. The feather samples in this study were kept, until all twenty feather samples were collected which took

approximately five months. Molted feathers of six parrots were collected within a month and analyzed directly and all were resulted by successful DNA isolation with method 1. The other four successful isolations were performed with the molted feathers that were stored up for three months. But DNA from the feathers older than three months was not isolated qualified enough to perform PCR for gender identification. For a good yield of genomic DNA, feather samples are need to be fresh and this affects the isolation and quality of genomic DNA.

Feather samples of three parrots were contaminated with feces, two of them were stored for three months and the other for five months. Genomic DNA was not obtained from none of those molted feathers. Isolation of DNA could have been much more successful if all the feather samples were free from feces. If molted feather is planning to be used for gender identification, one of the key factors is the housing the parrot in an individual cage. Therefore samples were not collected from pair housing cages. Otherwise feather samples might be mislabeled and gender identification can be misidentified. Amplification of CHDW and CHDZ genes in order to gender identification was performed successfully with 2550F and 2718R primer pairs. The sizes of the PCR products of this study for CHD Z (600bp) and CHDW (450bp) genes were conform to previous study performed by Fridolffson and Ellegren (1999) in different bird species since CHD gene is a conserved region between avian and mammalian species (Stevanov-Pavlovic 2013).

In conclusion, the primer pairs used in this study (2550F and 2718R) are usable in gender identification of African grey parrot with DNA analyzes of CHDW and CHDZ genes. If molted feathers were picked as a material for gender identification, method 1 can suggested to be used for DNA isolation but feather samples should be fresh and clean. Further practical, efficient and painless DNA isolation methods should be developed for gender identification in monomorphic bird species from molted feather and feces. However these samples should be obtained fresh, otherwise performing a successful DNA isolation could be challenging.

## REFERENCES

- Anonymous.** [http://diagnostics1.com/MANUAL/General\\_Qiagen.pdf](http://diagnostics1.com/MANUAL/General_Qiagen.pdf); Accession date; 20.09.2017
- Anonymous.** [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink\\_genomic\\_manifest.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/purelink_genomic_manifest.pdf); Accession date; 18.09.2017

- Bosnjak J, Stevanov-Pavlovic M, Vucicevic M, Stevanovic J, Simeunovic P, Resanovic R, Stanimirovic Z.** Feasibility of non-invasive molecular method for sexing of parrots. *Pakistan J Zool.* 2013; 45(3): 715-720.
- Bush KL, Vinsky MD, Aldridge CL, Paszkowski CA.** A comparison of sample types varying in invasiveness for use in DNA sex determination in an endangered population of Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Conserv Genet.* 2005; 6: 867-870.
- Cerit H, Avanus K.** Sex determination by CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turk J Vet Anim Sci.* 2007<sup>a</sup>; 31(6): 371-374.
- Cerit H, Avanus K.** Sex identification in avian species using DNA typing methods. *Worlds Poult Sci.* 2007<sup>b</sup>; 63: 91-99.
- Ellegren H, Carmichael A.** Multiple and independent cessation of recombination between avian sex chromosomes. *Genetics.* 2001; 158: 325-331.
- Ellegren H.** First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc Lond.* 1996; 263: 1635-1641.
- Ellegren H.** Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W? *EMBO Rep.* 2001; 2: 192-196.
- Fridolfsson A, Ellegren H.** A simple and universal method for molecular sexing of nonratite birds. *J Avian Biol.* 1999; 30: 116-121.
- Fridolfsson AK, Ellegren H.** Molecular evolution of the avian CHD1 genes on the Z and W sex chromosomes. *Genetics.* 2000; 155: 1903-1912.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RGJ.** A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol.* 1998; 7: 1071-1075.
- Griffiths R, Korn RM.** A CHD1 gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene.* 1997; 197: 225-229.
- Griffiths R, Tiwari, B.** Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature.* 1995; 375: 454.
- Griffiths R., Tiwari B.** The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 83248326.
- Handley LJ, Ceplitis H, Ellegren H.** Evolutionary strata on the chicken Z chromosome: implications for sex chromosome evolution. *Genetics.* 2004; 167: 367-376.
- Harvey MG, Bonter DN, Stenzler LM, Lovette IJ.** A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *J Field Ornithol.* 2006; 77(2):136-140.
- Heinsohn R, Legge S, Barry S.** Extreme bias in sex allocation in *Eclectus* parrots. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1997; 264: 1325-1329.
- Saino N, Ellegren H, Moller AP.** No evidence for adjustment of sex allocation in relation to paternal ornamentation and paternity in barn swallows. *Mol Ecol.* 1999; 8: 399-406.
- Stevanov-Pavlovic M, Vucicevic M, Bosnjak J, Stevanovic J, Dimitrijevic V, Resanovic R, Stanimirovic Z.** Molecular sex determination of 20 bird species protected in The Republic of Serbia. *Acta Vet (Beogr)* 2013; 63: 45-51.
- Suriyaphol G, Kunasut N, Sirisawadi S, Wanasawaeng W, Dhitavat S.** Evaluation of dried blood spot collection paper blotters for avian sexing by direct PCR. *Br Poult Sci.* 2014; 55: 321-328.
- Trewick SA.** On the skewed sex ratio of the Kakapo *Strigops habroptilus*: sexual and natural selection in opposition? *Ibis.* 1996; 139: 652-663.
- Vucicevic M, Stevanov-Pavlovic M, Stevanovic J, Bosnjak J, Gajic B, Aleksic N, Stanimirovic Z.** Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. *Zoo Biol.* 2013; 32: 269-276.



## Canine Visceral Leishmaniasis'in Farklı Evrelerinde Ekokardiyografik Ejeksiyon Fraksiyonu ve Fraksiyonel Kısalmanın Değerlendirilmesi<sup>#</sup>

Canberk BALIKCI<sup>1\*</sup> Kerem URAL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Aydın, Türkiye

<sup>#</sup> Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-1507 nolu proje ile desteklenmiştir.

\*Corresponding author e-mail: canberkbalicki@gmail.com

### ÖZ

Bu çalışmada Canine Visceral Leishmaniasis'in farklı evrelerinde ejeksiyon fraksiyonu (EF) ve fraksiyonel kısalma (FS) parametrelerinin değerlendirilerek tanıda ve sağaltım monitörizasyonunda fayda sağlaması amaçlanmıştır. Araştırmanın materyalini, 28'i *L. infantum* ile doğal enfekte 7'si de sağlıklı olmak üzere toplam 35 köpek oluşturdu. Klinik bulgular temelinde VL şüpheli tanısı konulan köpeklerde kan örneğinde hızlı ELİSA prensibiyle çalışan test kiti pozitifliği ile VL tanısı kesinleştirildi. Çalışmaya dahil edilmesi uygun görülen VL'li köpekler, "LeishVet Çalışma Grubu" nun önerdiği evreleme dikkate alınarak 4 farklı gruptan (her grupta n=7) birinde değerlendirildi. EKO, M mod incelemeler sağ parasternal kısa ekseninde gerçekleştirildi ve sol ventrikül EF ve FS parametreleri belirlendi. Çalışmadaki kontrol grubu olguların EF değeri (%) 48 ile 74 ve FS değeri (%) 24 ile 38, olduğu saptandı. I. gruptaki olgularda EF değeri (%) 59 ile 74 ve FS değeri (%) 31 ile 42 arasında olduğu görüldü. II. gruptaki olgularda EF değeri (%) 58 ile 93 ve FS değeri (%) 29 ile 63 arasında idi. III. gruptaki olgularda EF değeri (%) 35.3 ile 93.8 ve FS değeri (%) 16.4 ile 50 arasında değişmekteydi. IV. gruptaki olgularda ise EF değeri (%) 52 ile 82 ve FS değeri (%) 27 ile 50 arasında olduğu belirlendi. Sonuç olarak Leishvet Çalışma Grubunun serolojik, klinik ve laboratuvar bulguları dikkate alındığında 4 farklı grupta (evre I-IV) yer alan olgularımızda ekokardiyografik [FS'de ve EF'de azalma (sistolik disfonksiyon)] değerlendirmenin CVL'li köpeklerde dikkate alınması gerektiği söylenebilir. CVL'li köpeklerde intravital diyagnoza katkı sağlayan kardiyak değişikliklerin üzerinde önemle durulması ve gerekli ilave sağaltım protokollerinin uygulanması fayda sağlayabilir.

**Anahtar kelimeler:** Leishmaniasis, ekokardiyografi, ejeksiyon fraksiyonu, fraksiyonel kısalma, köpek

### Assessment of Echocardiographic Ejection Fraction and Fractional Shortness at Different Stages of Canine Visceral Leishmaniasis

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to evaluate EF and FS parameters at different stages of canine visceral leishmaniasis to benefit in diagnosis and treatment monitoring. A total of 35 dogs, 28 of which were infected with *L. infantum* and 7 of which were healthy, constituted the material of study. VL diagnosis was confirmed with test kit positivity with fast ELISA on blood samples. VL dogs eligible for inclusion into study were evaluated in 4 different groups (n = 7, each group), according to "LeishVet Working Group". ECHO, studies were performed on the right parasternal short axis and EF and FS parameters were detected. In control group, EF values (%) was found between 48 and 74, FS(%) value between 24 and 38. EF value was found between 59 and 74, FS value was between 31 and 42 in group I. EF value was found between 58 and 93, FS value was between 29 and 63 in group II. EF value was found between 35.3 and 93.8, FS value was between 16.4 and 50 in group III. EF value was between 52 and 82, FS value was between 27 and 50 in group IV. As a result, when we considered the LWG, it can be said that echocardiographic evaluation [reduction in FS, EF (systolic dysfunction)] should be performed into account in CVL dogs. It may be beneficial to focus on cardiac changes contributing to the intravital diagnosis in CVL dogs and to apply the necessary additional treatment protocols.

**Key words:** Leishmaniasis, echocardiography, ejection fraction, fractional shortening, dog

## GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından zoonotik, çeşitli uygulamalarla kontrol altına alınmadığında prognozu kötü sonuçlanan, oldukça önemli ve üzerinde durulması gereken aciller arasında gösterilen Visseral Leishmaniasis (VL) günümüzde hem insanlarda hem de köpeklerde gösterdiği yakın hastalık bulgularıyla öne çıkmaktadır. Hastalık durumunda köpekler hem rezervuar hem de konak olarak rol göstererek memeli hayvanları ve toplum sağlığını tehdit etmektedir. Türkiye de dahil olmak üzere hastalığın belirlendiği 88 ülkede 200 milyon insanın tehlike altında olduğu, her enfekte 1 insana karşı, öncesinde en az 200 köpeğin enfekte olmasına karşılık geldiği bilinmektedir (Candido ve ark., 2008).

Canine Visceral Leishmaniasis'de meydana gelen klinik bulgular parazitin kendisi tarafından oluşturulmakta, oluşan aşırı miktardaki B hücre aktivitesi dolaşımında immunkomplekslerin açığa çıkmasına ve bunların doku ve organlarda depolanması sonucunda poliartritis, üveitis, glomerulonefrit ve vaskülitis şekillenmesine neden olmaktadır (Lopez ve ark., 1996). CVL'de oluşan bazı deri lezyonlarının vaskülitisle ilişkili olduğu düşünülmektedir (Affolter, 1997). Buna karşın CVL'de oluşan iç organlardaki hasarın generalize vaskülitis ile ilişkili olduğu nadiren tanımlanabilmektedir (Pumarola ve ark., 1991). Bunun yanı sıra CVL ile ilişkili miyokarditis nadiren bildirilmektedir.

Kalpde gelişen hasarın ve şekillenen patolojik değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan, altın diagnostik öneme sahip muayene yöntemlerinden birisi de ekokardiyografidir (EKO). EKO, küçük hayvan sağlığında edinsel ve kongenital kalp yetmezliklerinin tanısında 1970'lerin sonundan beri kullanılmaktadır (Mashiro ve ark., 1976; Torre ve ark., 2000). Fakat leishmaniasisli köpeklerde kalpteki patolojik değişikliklere yönelik az sayıda literatür bulunmaktadır. Bir çalışmada leishmaniasisli köpeklerde EKO muayenesi yapılmış ve sonucunda sekonder sistemik hipertansiyon nedenli sol ventriküler hipertrofi belirlenmiştir (Cortadellas ve ark., 2006). Leishmaniasisli köpeklerde yapılan başka bir çalışmada ise yapılan EKO muayenesi sonucunda bir köpekte pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) belirlenmiştir. Fakat araştırmacılar, ilerideki çalışmalarda olgu sayısını artırarak çalışmanın tekrarlanması gerektiği kanısına varmışlardır. (Paradies ve ark., 2012).

Çeşitli saf ırk köpek kalplerinin anatomik verilerinin sağlanması amacıyla yapılan ekokardiyografik

ölçümler ile ilgili çalışmalarda da görüldüğü üzere sol ventriküler sitolik ve diyastolik çaplar (LVIDs, LVIDd), ejeksiyon fraksiyonu (EF), fraksiyonel kısalma (FS) gibi ölçüm parametreleri kalbin fonksiyonel ve anatomik olarak değerlendirilmesinde önemli yere sahiptir (Bavegms ve ark., 2007; Gooding ve ark., 1986; Gugjoo ve ark., 2014).

FS ve EF kalbin sistolik performansını değerlendirmeye yarayan parametrelerdir. Çeşitli yapılan çalışmalarda köpeklerdeki referans aralığı diğer bazı parametreler ile (LVIDd, LVIDd) belirlenmiştir (Bavegms ve ark., 2007; Crippa ve ark., 1992; Gugjoo ve ark., 2014; Lehtinen ve ark., 2016; Lonsdale ve ark., 1998; Tai ve Huang., 2013). Bu çalışmada canine visceral leishmaniasisin farklı evrelerinde EF ve FS parametrelerinin değerlendirilerek tanıda ve sağaltım monitörizasyonunda fayda sağlanması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırmanın hayvan materyalini, 28'i *L. infantum* ile doğal enfekte (önceden herhangi bir sağaltım uygulaması yapılmamış), 7'si de sağlıklı olmak üzere toplam 35 köpek oluşturdu. Enfekte köpekler, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları Küçük Hayvan Kliniği'ne CVL ile uyumlu klinik bulgulardan (hipotrikozis, perioküler alopesi, deri lezyonları, kilo kaybı, onikogripozis, lenfadenopati ve benzeri) bir ya da birkaçını gösteren olgulardan seçildi. Araştırma protokolü, Adnan Menderes Üniversitesi HADYEK tarafından onaylanmıştır (no: 64583101/2014/118, 29.08.2014).

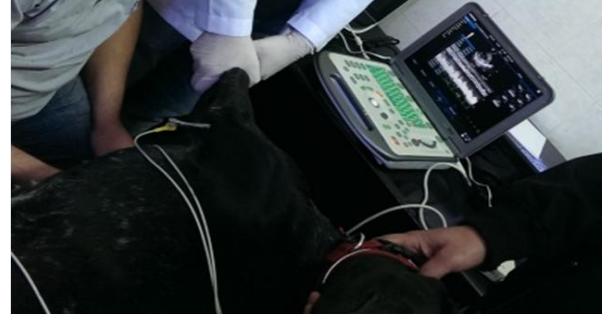
Klinik bulgular temelinde VL şüpheli tanısı konulan köpeklerde lenf yumrusu aspiratında amastigot görülmesi ve/veya kan örneğinde hızlı ELISA prensibiyle çalışan test kiti (Snap Leishmania, Idexx, USA) pozitifliği ile VL tanısı kesinleştirildi (Athanasios ve ark., 2014). *L. infantum* ile enfekte olduğu saptanan köpeklerin vektörlerle nakledilen ve kardiyak hasara yol açabilen *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi* ve *Dirofilaria immitis* ile koenfekte olup olmadıkları hızlı test kiti (SNAP 4Dx plus, Idexx, USA) ile araştırıldı ve yalnızca *L. infantum* ile enfekte köpekler çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilmesi uygun görülen VL'li köpekler, "LeishVet Çalışma Grubu" nun serolojik, klinik ve laboratuvar bulgular temelinde önerdiği evreleme (Solano-Gallego ve ark., 2011) dikkate alınarak 4 farklı gruptan (her grupta n=7) birinde değerlendirildi. Buna göre;

I. grupta CVL'in I. evresindeki olgular (hafif),

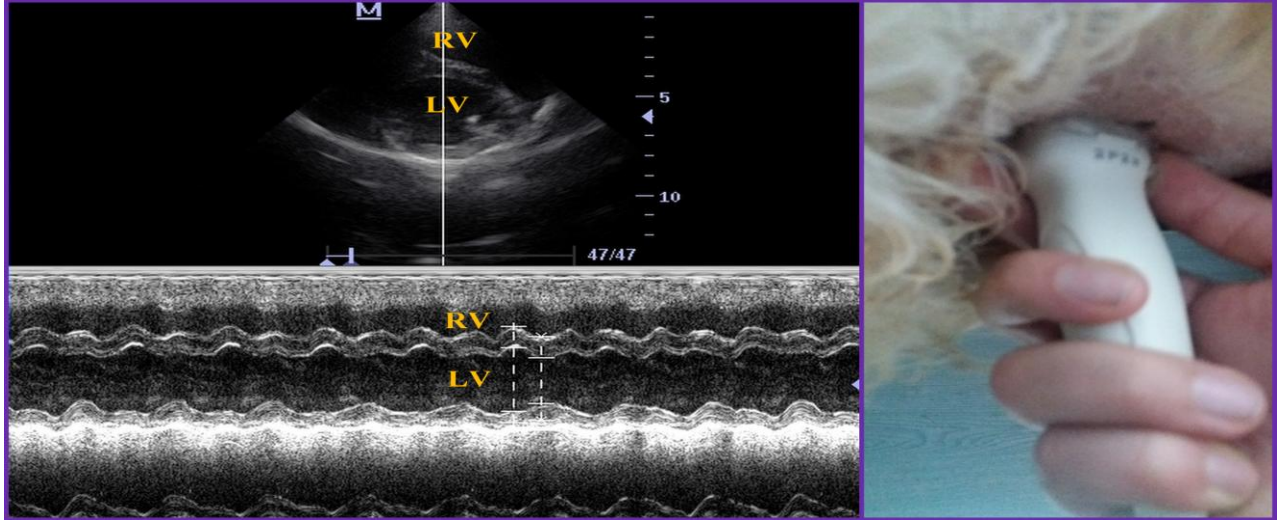
II. grupta CVL'in II. evresindeki olgular (orta şiddetli),  
III. grupta CVL'nin III. evresindeki olgular (şiddetli) ve  
IV. grupta CVL'nin IV. evresindeki olgular (çok şiddetli) olgular yer aldı.  
Sağlıklı kontrol grubu (V. grup), kliniğe aşı veya sağlık kontrolü amacıyla getirilen, klinik ve laboratuvar değerlendirilmelerinde herhangi bir anormallik saptanmayan her iki cinsiyetten ve VL'li gruplarına benzer yaş aralığındaki köpeklerden (n=7) oluşturuldu.

Olguların iki boyutlu M mod EKO incelemeleri, portatif EKO cihazı kullanılarak yapıldı (Mindray M5, Türkiye). EKO, M mod incelemeler köpekler sağ tarafına yatırılarak, sağ parasternal kısa eksen (4.-6. interkostal aralık) ultrason jeli kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 1-2). Muayeneden hemen önce olguların, sağ koltuk altı bölgesi tıraş edildi. Sonuçlar üzerine etki oluşturmaması adına, EKO uygulamasında herhangi bir anesteziik madde kullanılmadı. EKO ölçümlerinde kategorik parametreler sol ventrikül EF ve FS parametreleri belirlendi. Dolayısıyla da ejeksiyon fraksiyonu (EF),

fraksiyonel kısalma (FS) ölçüldü (Biais ve ark., 2012; Mashiro ve ark., 1976; Mjlstada ve ark., 2012; Testuz ve ark., 2013).



**Şekil 1.** Olguların ekokardiyografik muayenelerinin gerçekleştirilmesi  
**Figure 1.** Realization of echocardiographic examinations of cases



**Şekil 2.** Sağ parasternal kısa ekseninde sağ ve sol ventrikülün görüntülenmesi  
**Figure 2.** Right and left ventricular imaging atright parasternal short axis

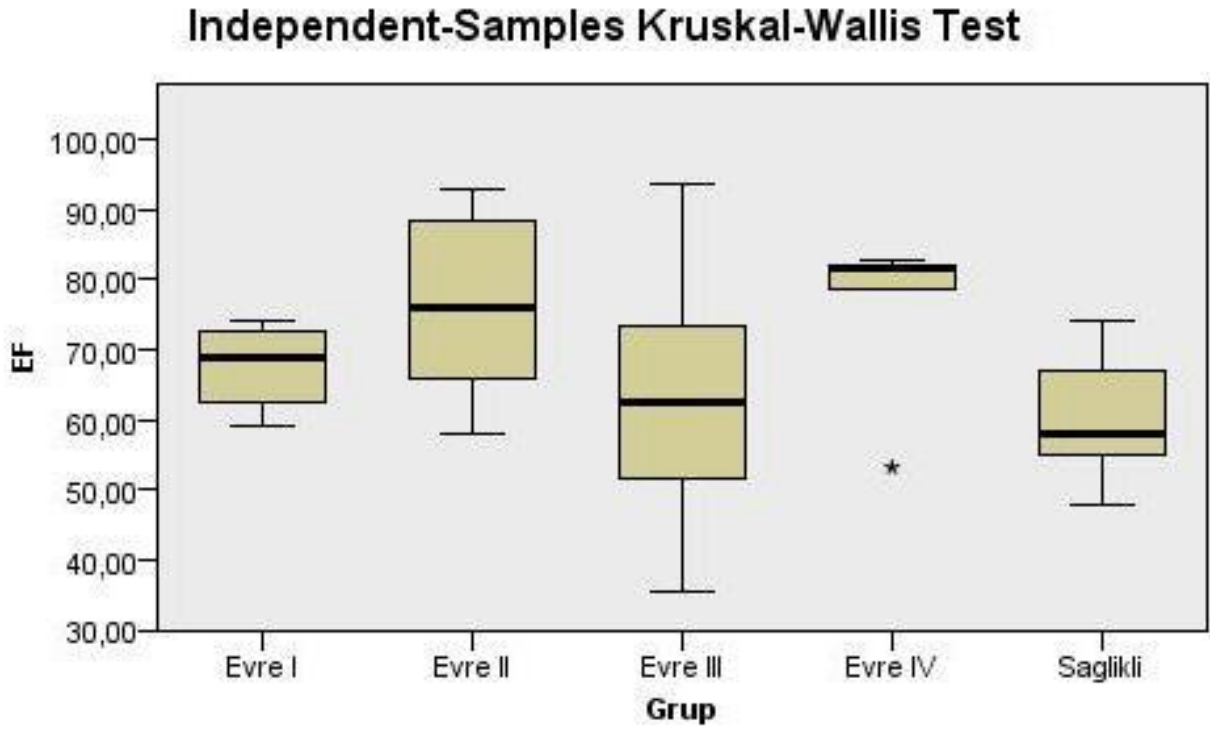
## BULGULAR

Leishmaniasis ile enfekte (I.-IV.) grupların ve kontrol grubunun (V.) EKO muayenesi tek sefer yapılmıştır. Çalışmadaki kontrol grubu olguların EF değeri (%) 48 ile 74 ve FS değeri (%) 24 ile 38 olduğu saptandı. Grup I'de IV'e doğru EF değerleri

sırasıyla % 59-74, 58-93, 35.3-93.8, 52-82 ve FS değerleri ise sırasıyla 31-42, 29-63, 16.4-50, 27-50 olarak tespit edildi. (Tablo 1). İncelenen parametrelerde (FS, EF) bireysel manada istatistiksel olmayan farklılıklar mevcut olsa da, genel değerlendirmede gruplar arası farklılık saptanamadı (Şekil 3-4).

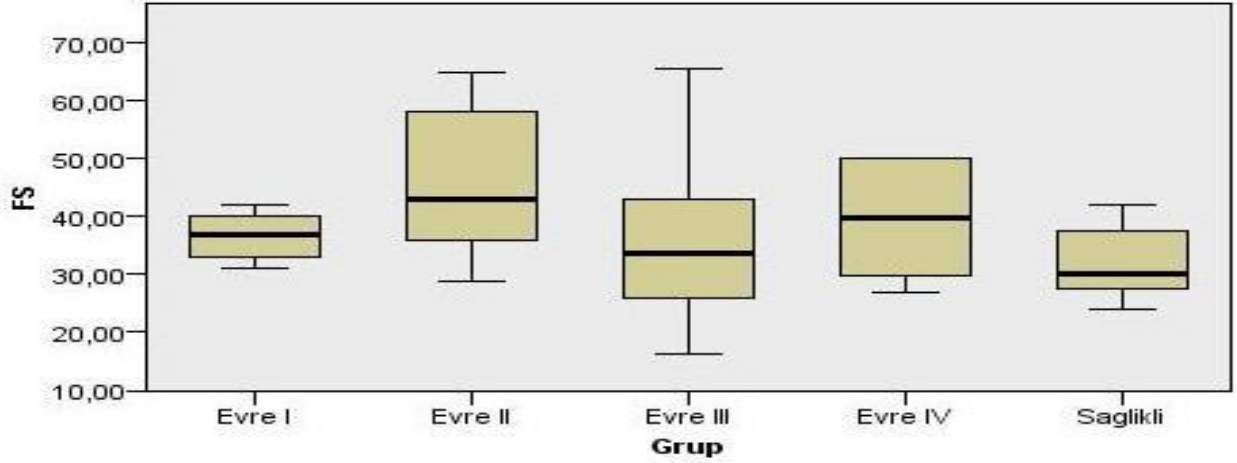
**Tablo 1.**EKO bulgularının istatistiksel olarak değerlendirilmesi  
**Table 1.** Statistical evaluation of ECHO findings

Veri	Gruplar					P değeri
	I	II	III	IV	V	
EF	67.4±6.1 (59-74)	76.6±14.4 (58-93)	64.6±19.2 (35.3-93.8)	73±14 (52-82.6)	60.6±9.3 (48-74)	0.200
FS	36.6±4.4 (31-42)	46.4±14.4 (29-65)	37.2±16.2 (16.4-65.4)	37.6±11.2 (26.9-50)	32.3±6.8 (24-42)	0.635



**Şekil 3.**EF parametresinin gruplara göre dağılımına ilişkin kutu grafiği  
**Figure 3.**Box graph of distribution of EF parameter by groups

## Independent-Samples Kruskal-Wallis Test



Şekil 4. FS parametresinin gruplara göre dağılımına ilişkin kutu grafiği

Figure 4.Box graph of distribution of FS parameter by groups

### TARTIŞMA VE SONUÇ

CVL'de myokardiyel lezyonların gelişebileceği (Alves ve ark., 2010; Lopez-Pena ve ark., 2009; Torrent ve ark., 2005) ve hastalık etkeni olarak bilinen Leishmania türlerinin kardiyak dokuya penetrasyon yaptığı bildirimleri (Font ve ark., 1993; Lopez-Pena ve ark., 2009; Torrent ve ark., 2005; Zabala ve ark., 2005) göz önünde bulundurulduğunda, hastalığın farklı evrelerindeki köpeklerde kardiyak tutulumun EKO muayeneleri ile araştırılması gerekliliği açıktır. İlavenen kardiyak ritim bozuklukları ve supuratif karakterde olmayan myokarditis gibi değişikliklerin oluşageldiği çeşitli çalışmalarda saptanmıştır (Blavier ve ark., 2001; Lopez-Pena ve ark., 2009; Torrent ve ark., 2005; Zabala ve ark., 2005). Alves ve ark.(2010) CVL ile infekte köpeklerin sitolojik muayenesinde 2 semptomatik köpeğin kalp ve akciğerinde ve 1 asemptomatik köpeğin kalbinde amastigotları belirlemişlerdir.

Tai ve Huang, (2013) 40 adet sağlıklı köpek üzerinde gerçekleştirmiş olduğu çalışmada EF (%) ve FS (%) ölçümlerini (ortalama  $\pm$  standart sapma) sırasıyla  $75.2 \pm 14.7$ ,  $44.3 \pm 6.8$  olarak belirlemişlerdir. Gugjoo ve ark. (2014) 24 adet sağlıklı Labrador retriever köpek üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada EF(%) ve FS (%) ölçümünü sırasıyla  $65.5 \pm 2.15$  ve  $35.9 \pm 1.56$  olarak tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmadaki aynı ölçümlerin aralıkları (min-maks) ise aynı sıra ile  $45.5-81.35$  ve  $18.75-49.6$  olarak belirlenmiştir. Lehtinen ve ark. (2016) 78 adet sağlıklı Salukis ırkı köpek üzerinde gerçekleştirmiş olduğu çalışmada EF(%) ve FS (%) ölçümünü sırasıyla  $48,9$ ,  $27,5$  olarak bulunmuştur. Yapılan çalışmadaki aynı ölçümlerin aralıkları (min-maks) ise aynı sıra ile  $38,6-59,1$  ve  $20,3-34,6$  olarak belirlendiği bildirilmiştir. Bavegems ve ark.

(2007) 105 adet sağlıklı Whippet ırkı köpek üzerinde gerçekleştirmiş olduğu çalışmada EF(%) ve FS (%) ölçümünü sırasıyla  $61.3 \pm 8.1$  ve  $27.7 \pm 5.2$  olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmadaki aynı ölçümlerin aralıkları (min-maks) ise aynı sıra ile  $44.7-77.3$  ve  $18.1-39.2$  olarak belirlendiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada Lonsdale ve ark.(1998) 39 adet sağlıklı, antreman yaptırılan/antreman yaptırılmayan Greyhound ırkı köpeklerde FS (%) değerini sırasıyla  $33 \pm 6$  ve  $30 \pm 6$  olarak belirlemişlerdir. Crippa ve ark. (1992) 50 adet sağlıklı Beagle ırkı köpek üzerinde yapmış oldukları çalışmada EF(%) ve FS (%) ölçümünü sırasıyla  $77 \pm 10$  ve  $40 \pm 9$  olarak belirlemişlerdir. Yapılan çalışmadaki aynı ölçümlerin aralıkları (min-maks) ise aynı sıra ile  $40-100$  ve  $20-70$  olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise EF (%) ölçümü gruplara göre sırasıyla (evre I, evre II, evre III, evre IV ve sağlıklı grubun ortalama  $\pm$  standart sapma ve aralığı)  $67,4 \pm 6,1$  (59-74),  $76,6 \pm 14,4$  (58-93),  $64,6 \pm 19,2$  (35,3-93,8),  $73 \pm 14$  (52-82,6) ve  $60,6 \pm 9,3$  (48-74) olarak belirlendi. FS (%) ölçümü gruplara göre sırasıyla (evre I, evre II, evre III, evre IV ve sağlıklı grubun ortalama  $\pm$  standart sapma ve aralığı)  $36,6 \pm 4,4$  (31-42),  $46,4 \pm 14,4$  (29-65),  $37,2 \pm 16,2$  (16,4-65,4),  $37,6 \pm 11,2$  (26,9-50) ve  $32,3 \pm 6,8$  (24-42) olarak belirlenmiştir.

Kardiyak fonksiyonların değerlendirilmesinde en sıklıkla kullanılan ekokardiyografik metot, M-mod sol ventriküler Fraksiyonel Kısalmanın (FS) ölçümüdür (Boon, 1998; Cornell ve ark., 2004; Kittelson ve Kienle, 1998; Moise ve Fox, 1999). Bunu destekler mahiyette sol ventriküler sistolik fonksiyonların Veteriner Hekimlik alanında değerlendirilmesi açısından detaylı literatür taramaları, köpeklerde gerçekleştirilen çoğu çalışmanın FS baz alınarak gerçekleştirildiğini

göstermektedir (Dukes-McEwan ve ark., 2003). Köpeklerde % 20 ile % 25 arasından daha az değerlerin anormal derecede düşük olduğu ve sistolik disfonksiyonu gösterdiği bildirilmektedir. Buna karşın eğer belirgin bir mitral regurgitasyon mevcutsa FS yanlış değerlendirilebilir. Sağlıklı köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda FS (%) değerinin >%30 olması gerektiği (Boon, 1998; Cornell ve ark., 2004; Kittelson ve Kienle, 1998; Moise ve Fox, 1999) ve bu değer altına düştüğü durumlarda dilate kardiyomyopati şekillenebileceği bildirilmektedir (Dukes-McEwan ve ark., 2003). Bizim çalışmamızda grupların ortalamalarına bakıldığında istatistiksel açıdan herhangi bir azalma ya da farklılık görülmemesine karşın olgular bireysel olarak değerlendirildiğinde evre II' de bir olguda (%29), evre III de iki olguda (%25 ve 16.4) ve evre IV'de ise 3 olguda (%27, 26.9 ve 29.8) FS değerinde azalma tespit edilmiştir. Evre arttıkça serum biyokimyasal biyobelirteçlerden bağımsız olarak FS değerinde azalma olan olgu sayısının arttığı tespit edilmiş, özellikle evre IV'de değerlendirilen 7 olgudan 3'ünün (%42.85) etkilendiği anlaşılmaktadır. Ancak bu olguların dilate kardiyomyopati ile ilişkilendirilmesi pek mümkün olmamıştır. Şöyleki dilate kardiyomyopatinin gelişiminde radyografik (çalışmamıza dahil edilmemiştir), ekokardiyografik ve post-mortem (çalışmamıza dahil edilen her olguda intravital diyagnoz geçerli olup, her olgu yaşamına devam etmekte, hiçbir olgu ex olmadığından bu muayene mümkün olmamıştır) muayenelerin yanı sıra sol ventrikül ile sol atriyumda genişleme şekillenebilmektedir (Baumwart ve ark., 2007; Belham ve ark., 2007; Chetboul ve ark., 2005; Chetboul ve ark., 2007; Cornell ve ark., 2004). Tüm bunların yanı sıra dilate kardiyomyopatinin kesin teşhisinde (a) sol ventriküler dilatasyon (b) azalmış sistolik fonksiyon ve (c) sol ventrikülde artmış olan küresel yapının birlikte değerlendirilmesi yatmaktadır (Baumwart ve ark., 2007; Belham ve ark., 2007; Chetboul ve ark., 2005; Chetboul ve ark., 2007; Cornell ve ark., 2004). Çalışmamızda CVL ile infekte 28 olgudan 6'sında FS değerinde şekillenen azalma sistolik disfonksiyona işaret etmektedir.

İnsanlarda ejeksiyon fraksiyonu, sistolik fonksiyonları değrlendirmede ana belirteç olarak kullanılmaktadır. EF'nin <%40 ya da <%50 olması anormal olarak değerlendirilmektedir. Sağlıklı köpekler üzerinde yapılan çalışmalarda EF (%) değerinin >%40 olması gerektiği ve bu değer altına düştüğünde sistolik fonksiyon kaybının şekillendiği bildirilmektedir (Dukes-McEwan ve ark., 2003). Bizim çalışmamızdaki gruplarda EF(%) değerinin ortalamasına bakıldığında herhangi bir azalma belirlenemezken gruplardaki olgulara

bireysel olarak bakıldığında evre III'deki bir olguda (% 35.3) EF değerinde azalma saptandı. Bunun yanı sıra sol ventriküler sistolik performans değerlendirilirken dilate kardiyomyopati köpeklerde sistol sonu ve diyastol sonu çaplarda artış, sol atriyumda dilatasyon ile gerek FS gerekse EF'lerinde azalma meydana gelebilmektedir (Kittelson ve Kienle, 1998).

Sonuç olarak Leishvet Çalışma Grubunun serolojik (İFAT titreleri ile hızlı ELİSA testleri), klinik ve laboratuvar bulguları (özellikle TP, ALB ve İPK) dikkate alındığında 4 farklı grupta (evre I-IV) yer alan olgularımızda ekokardiyografik [FS'de ve EF'de azalma (sistolik disfonksiyon)] değerlendirmenin CVL'li köpeklerde dikkate alınması gerektiği söylenebilir. CVL'li köpeklerde intravital diyagnoza katkı sağlayan kardiyak değişikliklerin üzerinde önemle durulması ve gerekli ilave sağaltım protokollerinin uygulanması fayda sağlayabilir.

## KAYNAKLAR

- Affolter VK.** Pathogenesis of vasculitis. Proceedings of the 14th Annual European Society of Veterinary Dermatologists/European College of Veterinary Dermatology Congress, Pisa, Italy. September 5 - 7, 1997, 147-150.
- Alves GBB, Pinho FA, Silva SMMS, Cruz MSP, Costa FAL.** Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania chagasi*. Brazil. J. Med. Biol. Res. 2010, 43, 310-315.
- Athanasiou LV, Petanides TA, Chatzis MK, Kasabalis D, Apostolidis KN, Saridomichelakis MN.** Comparison of two commercial rapid in-clinic serological tests for detection of antibodies against *Leishmania spp.* in dogs. J. Vet. Diag. Invest. 2014, 26(2), 286-290.
- Baumwart RD, Orvalho J, Meurs KM.** Evaluation of serum cardiac troponin I concentration in Boxers with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. Am. J. Vet. Res. 2007, 68 (5), 524-528.
- Bavegems V, Duchateau L, Sys SU, De Rick A.** Echocardiographic reference values in whippets. Vet. Radiol. Ultrasound. 2007, 48(3), 230-238.
- Belham M, Kruger A, Mephram S, Faganello G, Pritchard C.** Monitoring left ventricular function in adults receiving anthracycline-



- containing chemotherapy. *Europ. J. Heart Fail.* 2007, 9(4), 409–414.
- Biais M, Carrié C, Delaunay F, Morel N, Revel P, Janvier G.** Evaluation of a new pocket echoscopic device for focused cardiac ultrasonography in an emergency setting. *Crit. Care.* 2012, 16(2), 1-7.
- Blavier A, Keroack S, Denerolle PH, Goy-Thollot I, Chabanne L, Cadore JL, Bourdoiseau G.** Atypical Forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.* 2001, 162, 108-120.
- Boon JA.** Appendix IV. In: *Manuel of Veterinary Echocardiography.* Boon JA, ed. Baltimore Maryland: Lippincott Williams & Wilkins 1998, pp, 453–463.
- Candido TC, Perri SHV, Gerzoschkwitz TO, Luvizotto MCR, Lima VMF.** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay based on crude and purified antigen in the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in symptomatic and oligosymptomatic dogs. *Vet. Parasitol.* 2008, 157, 175-181.
- Chetboul V, Tidholm A, Nicolle A, Sampedrano CC, Gouni V, Pouchelon JL, Lefebvre HP, Concordet D.** Effects of animal position and number of repeated measurements on selected two-dimensional and M-mode echocardiographic variables in healthy dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2005, 227(5), 743-747.
- Chetboul V, Serres F, Gouni V, Tissier R, Pouchelon JL.** Radial strain and strain rate by two-dimensional speckle tracking echocardiography and the tissue velocity based technique in the dog. *J. Vet. Cardiol.* 2007, 9 (2), 69-81.
- Cornell CC, Kittleson MD, Della Torre P, Häggström J, Lombard CW, Pedersen HD, Vollmar A, Wey A.** Allometric scaling of M-mode cardiac measurements in normal adult dogs. *J. Vet. Int. Med.* 2004, 18 (3), 311-321.
- Cortadellas O, Fernandez del Palacio MJ, Bayon A, Talavera J.** Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J. Vet. Int. Med.* 2006, 20, 941-947.
- Crippa L, Ferro E, Melloni E, Brambilla P, Cavalletti E.** Echocardiographic parameters and indices in the normal Beagle dog. *Lab. Anim.* 1992, 26(3), 190-195.
- Dukes-McEwan J, Borgarelli M, Tidholm A, Vollmar AC, Häggström J, ESVC Taskforce for Canine Dilated Cardiomyopathy.** Proposed guidelines for the diagnosis of canine idiopathic dilated cardiomyopathy. *J. Vet. Cardiol.* 2003, 5(2), 7-19.
- Font A, Closa JM, Molina A, Mascort J.** Thrombosis and nephrotic syndrome in a dog with visceral leishmaniosis. *J. Small Anim. Pract.* 1993, 34, 466-477.
- Gooding JP, Robinson WF, Mews GC.** Echocardiographic assessment of left ventricular dimensions in clinically normal English cocker spaniels. *Am. J. Vet. Res.* 1986, 47(2), 296-300.
- Gugjoo MB, Hoque M, Saxena AC, Zama MS, Dey S.** Reference values of M-mode echocardiographic parameters and indices in conscious Labrador Retriever dogs. *Iran. J. Vet. Res.* 2014, 15(4), 341.
- Kittelson MD, Kienle RD.** Echocardiography. In: *Small Animal Cardiovascular Medicine.* Kittelson MD, Kienle RD, eds. St. Louis: Mosby 1998, 95–117.
- Lehtinen SM, Wiberg ME, Häggström J, Lohi H.** <http://sonopath.com/articles/breed-specific-reference-ranges-for-echocardiography-in-salukis>. Erişim tarihi. 04.08.2016.
- Lonsdale RA, Labuc RH, Robertson ID.** Echocardiographic parameters in training compared with non-training Greyhounds”, *Vet. Radiol. Ultrasound* 1998, 39(4), 325-330.
- Lopez R, Lucena R, Novales M, Ginel PJ, Martin E, Molleda JM.** Circulating immune complexes and renal function in canine leishmaniasis. *Zentr. Vet. Reihe. B.* 1996, 43, 469-474.
- Lopez-Pena M, Aleman N, Munoz F, Fondevila D, Suarez ML, Goicoa A, Nieto JM.** Visceral leishmaniasis with cardiac involvement in a dog: a case report. *Acta Vet. Scand.* 2009, 51, 20.
- Mashiro IWAO, Nelson RR, Cohn JN, Franciosa JA.** Ventricular dimensions measured noninvasively by echocardiography in the awake dog. *J. App. Physiol.* 1976, 41(6), 953-959.
- Mjølstada OC, Snarea SR, Folkvord L, Helland F, Grimsdøe A, Torpa H, Haraldseth O, Haugena BO.** Assessment of left ventricular function by GPs using pocket-sized ultrasound. *Family Pract.* 2012, 29, 534-540.
- Moise NS, Fox PR.** Echocardiography and Doppler imaging. In: *Textbook of Canine and Feline Cardiology*, 2nd edn. Fox P R, Sisson D, Moise NS, eds. Philadelphia: Saunders, 1999, 130–171.
- Paradies P, Sasanelli M, Zaza V, Spagnolo P, Ceci L, Caprariis de D.** Doppler

- Echocardiographic Prediction of Pulmonary Hypertension in Canine Leishmaniasis. *Vet. Sci.* 2012, 20, 119-123.
- Pumarola M, Brevik L, Badiola J, Vargas A, Domingo M, Ferrer L.** Canine leishmaniasis associated with systemic vasculitis in two dogs. *J. Comp. Pathol.* 1991, 105(3), 279-286.
- Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Baneth G.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit.Vectors.* 2011, 4(1), 86.
- Tai TC, Huang HP.** Echocardiographic assessment of right heart indices in dogs with elevated pulmonary artery pressure associated with chronic respiratory disorders, heartworm disease, and chronic degenerative mitral valvular disease. *Vet.Med. (Praha).* 2013, 58(12), 613-620.
- Testuz A, Müller H, Keller PF, Meyer P, Stampfli T, Sekoranja L, Burri H.** Diagnostic accuracy of pocket-size handheld echocardiographs used by cardiologists in the acute care setting. *Eur. Heart J. Cardiovasc.Imaging.* 2013, 14(1), 38-42.
- Torre PD, Kirby AC, Church DB, Malik R.** Echocardiographic measurements in Greyhounds, Whippets and Italian Greyhounds-dogs with a similar conformation but different size. *Aust. Vet. J.* 2000, 78(1), 49-55.
- Torrent E, Leiva M, Segalés J, Franch J, Peña T, Cabrera B, Pastor J.** Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog. *J. Small Anim. Pract.* 2005, 46, 549–552.
- Zabala EE, Ramírez OJ, Bermúdez V.** Leishmaniasis visceral em um canino. *Rev. Fac. Cienc. Vet.Univ. Cent.Venez.* 2005, 46, 43-50.



## Atak-S ve Isa Brown Tavukları Arasındaki Genetik Çeşitliliğin SSR Belirteçleri ile Tahmini<sup>#</sup>

Selçuk ÖZDEMİR<sup>1\*</sup>, Harun ARSLAN<sup>2</sup>, Uğur ÖZENTÜRK<sup>3</sup>, Fatih YILDIRIM<sup>3</sup>, Ahmet YILDIZ<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

<sup>2</sup> Atatürk Üniversitesi, Su Ürünleri Fakültesi, Temel Bilimler Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

<sup>3</sup> Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Zootekni Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

<sup>#</sup>Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi PRJ2016/70 no'lu BAP projesi tarafından desteklenmiştir.

\*Corresponding author e-mail: selcuk.ozdemir@atauni.edu.tr

### ÖZ

Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü tarafından geliştirilen Atak-S yumurtacı hibriti yerli hibritler içinde yumurta verimi en yüksek olan hibrittir. Ancak bu hibritin yumurta verimi Isa Brown gibi yabancı kaynaklı hibritlere göre daha düşüktür. Atak-S hibritinin yabancı kaynaklı hibritlerle yarışabilmesi için verim ile ilgili moleküler ıslah çalışmaları gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı Atak-S ve Isa Brown tavuk hibritlerindeki genetik çeşitliliği belirlemek ve bu hibritler arasındaki genetik çeşitliliği karşılaştırmaktır. Bu amaç için, iki alt popülasyondan 200 tavukta 6 mikrosatelit lokusu ayrı ayrı genotiplendirildi. Bu çalışmada kullanılan 6 farklı SSR markörü için toplam da 85 polimorfik fragment bulundu. Ayrıca  $H_e$  değeri  $0.61 \pm 0.05$  olarak bulundu. İki hibrit arasında  $H_e$  ise; Atak-S'de  $0.35 \pm 0.76$ , Isa Brown'da  $0.26 \pm 0.68$  olarak bulundu. Bu sonuç, Atak-S hibritindeki genetik çeşitliliğin Isa Brown hibritine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Ek olarak iki hibrite ait genetik farklılıklar ve popülasyon yapısı dendogram analizi yapılarak ortaya konmuş ve farklılıklar belirlenmiştir. Sonuç olarak Atak-S ve Isa Brown hibritleri içindeki ve arasında genetik çeşitliliklerin iyi korunmuş olduğu ileri sürülebilir. Mikrosatellit analizi ile tahmin edilen Atak-S ve Isa Brown hibritleri hakkındaki bilgiler, gelecekteki genetik varyasyon araştırmalarını tasarlamak ve koruma stratejileri geliştirmek için hedeflerin belirlenmesinde rehber olarak yararlı olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Atak-S; Isa Brown; SSR; Genetik çeşitlilik

### Estimated Genetic Diversity Between Atak-S and Isa Brown Chickens with SSR Markers

#### ABSTRACT

Atak-S layered hybrid, developed by the "Ankara Poultry Research Institute", is the hybrid with the highest egg productivity among local hybrids. However, egg yield are lower compared to foreign-origin hybrids such as Isa brown. Molecular development studies as to productivity are required for Atak-S hybrid to be able to compete with foreign-origin hybrids. The objective of this study was to detect genetic diversity within the breeds and to compare the Atak-S and Isa Brown breeds. To achieve this goal, we individually genotyped 6 SSR loci in 200 chickens from two populations. 85 polymorphic fragments were found in total for 6 different SSR markers employed in this study. For all loci, high  $H_e$  was observed, and means  $H_e$  was  $0.61 \pm 0.05$  among loci. Among breeds, the mean  $H_e$  was  $0.35 \pm 0.76$  in Atak-S and  $0.26 \pm 0.68$  in Isa Brown. This result indicated that genetic diversity in the Atak-S breed is higher than in the Isa Brown breed. Furthermore, genetic differences and population structure of two hybrids were shown by virtue of dendogram analysis and differences were detected. As a result, we could be suggested that genetic diversity is well preserved within and between Atak-S and Isa Brown hybrids. Based on the Atak-S and Isa Brown breeds estimated by microsatellite analysis may be useful as a guide in setting goals for designing future genetic variation studies and for improving conservation strategies.

**Key Words:** Atak-S; Isa Brown; SSR; Genetic diversity.

To cite this article: Özdemir S, Arslan H, Özentürk U, Yıldırım F, Yıldız A. Atak-S ve Isa Brown Tavukları Arasındaki Genetik Çeşitliliğin SSR Belirteçleri ile Tahmini. Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 53-62.

## GİRİŞ

Türkiye’de hızlı nüfus artışına bağlı olarak süt ve kırmızı et yanında daha ucuza alınabilen beyaz et ve yumurtaya olan talep daha cazip hale gelmiştir. Ayrıca bu artışa bağlı olarak iç ve dış pazarlara üretim yapan tavukçuluk işletmelerinin sayıları giderek artmıştır. Dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tavukçuluk işletmeleri genellikle yurtdışından ithal edilen parent stokların çiftleştirilmeleriyle elde edilen yumurtacı hibritleri kullanmaktadır (Balcı ve ark. 2003). Türkiye’de yerli hibritlerin geliştirilmesi amacıyla Ülkesel Tavukçuluk Projesi ve daha sonra Tavukçuluk Araştırma Geliştirme Projesi yapılmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda üretilen yerli hibritlerin yumurta veriminin yabancı hibritlere göre daha düşük bulunmuştur. Ancak yaşama gücünün daha yüksek veya eşdeğer olduğu tespit edilmiştir (Karaçay 2000, Çelik 1992, Büyükbecici ve Kadioğlu 1992). Bu kapsamda Ankara Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü tarafından Atak, Atak-S ve Atabey ticari yumurtacı hibritleri geliştirilmiştir (Durmuş ve ark. 2009).

Tavukçulukta meydana gelen en önemli gelişmelerden biri iki verim yönlü ve tek verim yönlü tavuk hibritlerinin yerini ticari hibritlerin almasıdır (Erensayın 2000a). Dış kaynaklı olarak ithal edilen çok sayıda yumurtacı ve etçi hibritler Türkiye’de yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır (Türkoğlu ve ark. 2004). Hibrit materyallerin yurt dışından ithal edilmesi ülkemiz tavukçuluğuna olumlu yönde katkı sağlamasının yanında bazı tavuk hastalıklarının (G.R.D., Marek, Laringo Traheitis, Gumboro) ülkemizde ortaya çıkmasına, damızlık temininde dışa bağımlılık gibi sakıncaları beraberinde getirmiştir (Erensayın 2000b). Bu nedenle damızlık materyal ihtiyacının yurt içinden karşılanması, yumurta yönlü yerli hibritlerimizin performansının yükseltilmesi, kapasite ve üretim düzeylerinin yapılacak moleküler ıslah çalışmalarıyla artırılması ülkemiz tavukçuluğu açısından oldukça önemlidir (Yığıtoğlu ve Testik 2008).

Yerli yumurtacı hibrit Atak ve Atak-S sırasıyla Rhode Island Red I (RIR)X Barred Rock1 (BAR) ve Rhode Island Red (RIR) X Colombian Rock (Col) çiftleşmeleri oluşturulmuştur (Fathel ve Elibol 2006). Atak-S yumurtacı hibritinin yumurta verimi ve yumurta ağırlığı yabancı kaynaklı Isa brown ve Novagen yumurtacı hibritlerine göre düşüktür. Ancak Atak-S yumurtacı hibritinin canlı ağırlığı yabancı hibritlere göre fazladır (Durmuş ve ark. 2009). Yerli yumurtacı hibritlerin yabancı yumurtacı hibritlerine verim yönünden yetişebilmesi için moleküler yöntemleri kullanarak yumurta verimiyle ilişkili markör analizinin yapılması, uygun markörler kullanılarak ilgili hibritlere ait ilişkilendirme

haritalamasının ortaya konması ve yumurta verimi yüksek çekirdek hibrit popülasyonlarının oluşturulması gerekmektedir.

Markör destekli seleksiyon çalışmalarında genel olarak SSR (basit dizi tekrarları) ve SNP (Single Nucleotide Polymorphism: Tek Nükleotid Polimorfizmi) kullanılmaktadır. SSR’lar içerdikleri nükleotid dizin sayısına göre mikrosatellit veya minisatellit olarak bilinir. Mikrosatellit markörlerin kullanım alanları; homozigot-heterozigot allel varyasyonlarının belirlenmesinde, genom haritalarının çıkarılmasında, popülasyonun genetik parametrelerinin tahmininde ve popülasyon farklılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadırlar (Wenz ve ark. 1998).

SNP’ler DNA dizini içerisinde baz /bazlarda meydana gelen nokta mutasyonların sebep olduğu polimorfizmler olarak bilinir. SNP polimorfizimlerini bulmak için SSCP analizi (Choi ve ark. 2014), heterodupleks analizi, Mikroarray yada doğrudan DNA dizilim analizleri kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en etkili DNA dizi analizi yöntemidir. DNA dizileri rastgele sıralama, PCR amplifikasyonu yapıldıktan sonra sıralama ve karşılaştırmalı EST analizleri kullanılarak sıralandırılır. Gelişen moleküler biyoloji teknikleri ile çok sayıda SNP’nin analizi hızlı ve güvenilir şekilde yapılabilmektedir. SNP’ler genel olarak, genetik çeşitlilik, popülasyon yapısı, kantitatif özellik lokusları (QTL), ve markör destekli seleksiyon (MAS) çalışmalarında kullanılmaktadır (Bakhtiarizadeh ve ark. 2012).

Bu araştırmanın amacı, Atak-S ve Isa Brown tavuk hibritlerindeki genetik çeşitliliği belirleyerek, tavukçuluk sektöründe yapılabilecek olan markör destekli moleküler ıslah çalışmalarına katkı sağlamaktır. Bu amaç için, iki alt popülasyondan 200 tavukta 6 mikrosatelit lokusu ayrı ayrı genotiplendirilmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Materyal

Araştırmada kullanılan hayvan materyali 200 adet Atak-S ve 200 adet Isa brown yumurtacı tavuklardan alınan kan örneklerinden oluşmuştur. Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (20.04.2016 tarihli ve AÜHAYDEK-E.1600096307)”.

### Metot

#### Genomik DNA İzolasyonu

Elde edilen kanlardan DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolasyonu Invitrogen PureLink Genomic DNA izolasyon kiti kullanılarak ve kitin

prosedürüne uygun olarak yapıldı. Genomik DNA izolasyonunda ilk olarak su banyosu veya ısı bloku 55°C'ye ayarlandı. Steril mikrosantrifuj tüpü içerisine 200 mikro litre donmuş veya taze kan örneği eklendi. Daha sonra üzerine 20 mikro litre Proteinaz K ve RNaz A eklendi ve kısa bir süre vortexle karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Daha sonra bu karışımın üzerine 200 mikro litre PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve karışım iyice homojenize olana kadar vortexle karıştırıldı. Daha sonra karışım 55 °C'ye ayarlanan su banyosu veya ısı blokunda 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra karışımın üzerine %96-100 moleküler grade ethanol eklendi ve karışım iyice homojenize olana kadar vortexte karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan karışım PureLink® Spin kolonun içerisine eklendi ve oda sıcaklığında 10.000xg 'de 1 dakika santrifuj edildi. Daha sonra spin kolon çıkartıldı ve temiz bir tüpün içerisine alındı. Spin colum üzerine 500 mikro litre Wash Buffer I eklendi ve oda sıcaklığında 10.000xg 'de 1 dakika santrifuj edildi. Daha sonra spin colum tekrar yeni bir tüpün içerisine alındı ve üzerine 500 mikrolitre Wash Buffer II eklendikten sonra oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifuj edildi. Santrifuj işleminden sonra spin column 1.5 mikrolitrelik steril mikrosantrifuj tüpünün içerisine alındı ve üzerine 200 mikro litre Elution Buffer eklendikten sonra 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak spin column oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifuj edildi ve böylece genomik DNA elde edildi. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de muhafaza edildi.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Kapillar Elektroferez

İlgili SSR markörleri polimeraz zincir reaksiyonunda analiz edildi. SSR markörlerine ait primer bilgileri Tablo 1' de verilmiştir. Her PCR deneyi 10 µl'lik karışımdan oluşmuştur. PCR karışımı: her bir primerden 5 pikomol, 1 µl 1X PCR tampon (10 mM Tris- HCl (pH 8.8), 50 mM KCl), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM nucleotit karışımı (dNTPs), 1 U Taq polimeraz ve 10-20 ng kalıp DNA ve steril distile su. PCR reaksiyonları ProFlex™ 3x32-Well PCR cihazı kullanılarak yapılmıştır (Thermo Fisher, USA). İlk denatürasyon 94 ° C'de 5 dakika yapıldı. Döngüsel denatürasyon 94 ° C'de 30 saniye, primer bağlanma 52-55 ° C'de (spesifik her primer için) 45 saniye süreyle ve 72 ° C'de 1 dakika 35 döngü boyunca gerçekleştirildi ve bunu takiben nihai 72 ° C'de 10 dakika boyunca uzatma yapıldı.

Multiplex PCR, floreson boyalı iki veya dört primer ile tek bir reaksiyonda gerçekleştirildi. Reaksiyon için kullanılan lokus setleri: 1) ADL136 ve ADL158; 2) ADL136 ve ADL176; 3) ADL158 ve

ADL176; 4) MCW043 ve MCW005; 5) MCW043 ve MCW049; 6) MCW005 ve MCW049; 7) ADL136, ADL158, MCW043, MCW005; 8) ADL158, ADL176, MCW005, MCW049.

PCR amplikonları kapillar elektroferez cihazı (Qiagen, Germany) kullanılarak analiz edildi. 1 ul amplikon, 11 ul 6X formamid yükleme boyası, bir denatüre edici ajan (Sigma) ve standart marker olan 0.3 µl ROX 500'ü içeren bir tampon ile karıştırıldı. Karışım 95 ° C'de 3 dakika boyunca denatüre edildi ve kapillar elektrofereze yüklenmeden önce buz üzerinde inkübe edildi. Allellerin çözünürlük modelleri, Genescan (sürüm 3.1) yazılımı kullanılarak incelendi ve boyut tahminleri Genotyper 3.1 yazılımı ile yapıldı. Alel skorlaması baz çiftleri halinde yapıldı.

### Veri Analizleri

Her bir SSR markörü için, parçacıklar (Matsuoka ve ark. 2002) tarafından tanımlan metot kullanarak farklı allel'leri temsil eden bin'lere bölündü. Her bir işaretleyici için polimorfizm bilgi içeriği (PIC-Polymorphism information content) değeri her bir SSR için (Saal ve Wricke 1999) tarafından tanımlan formüle göre hesaplandı:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^j P_i^2 - 2 \sum_{i=j+1}^j \sum_{j=1}^{i-1} P_i^2 P_j^2$$

pi i'inci allel'in sıklığını (frequency) ve k ise her lokus için farklı allel'lerin toplam sayısını vermektedir.

Bütün genotiplerin özgün bir lokus için mikrosatellite değerleri: var (present) için 1, yok (absent) için 0 ve heterozigot bireyler içinde 0.5 gibi değerlerle skorlandı. Bu veriler Nei'nin genetik benzerlik indeksinin (The Nei index of genetic similarity) hesaplanmasında kullanıldı (Nei ve Li 1979). Elde edilen bu değerler Darwin (Perrier ve Jacquemoud-Coller 2006) ve the NTSYS computer programı (Rohlf 1998) ile yapılan Aritmetik ortalama kullanılarak yapılan ölçülmemiş çift grup yöntemi (UPGMA - unweighted pair-group metodu) uygulanarak Tavuk örnekleri (accessions) arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir dendrogram oluşturulmasında kullanıldı. Bu çalışma sonunda 200 adet tavuktan oluşan bir çekirdek Atak-S ve Isa brown hibrit koleksiyon Powercore (Kim ve ark. 2007) program kullanılarak oluşturuldu. Oluşturulan bu koleksiyon ilişkilendirme analizlerinde kullanıldı.

### BULGULAR

Polimorfizm, bir lokusta iki veya daha fazla allelin ortaya çıkmasıdır. Bu çalışmada kullanılan tüm mikrosatellit lokuslarının, Botstein ve ark (1980)' na göre çok şekilli ve oldukça bilgilendirici olduğu bulunmuştur. Çalışılan 6 kromozom lokusu, istisnasız olarak incelenen tüm popülasyonların

genomları vasıtasıyla farklı allel sayılarıyla başarılı bir şekilde çoğaltıldı.

**Tablo 1:** Kullanılan primerlerin özellikleri (Rajkumar ve ark., 2008)

**Table 1:** Properties of used primers (Rajkumar ve ark., 2008)

SNP Adı	Primer sekansı	Bağlanma sıcaklığı °C	Tekrar Uniti	Genbank Giriş No
ADL136	F: TGT CAA GCC CAT CGT ATC AC R: CCA CCT CCT TCT CCT GTT CA	52	(TG)10 TC (TG)10	G01561
ADL158	F: TGG CAT GGT TGA GGA ATA CA 20 R: TAG GTG CTG CAC TGG AAA TC	52	(CA)12	G01582
ADL176	F: TTG TGG ATT CTG GTG GTA GC 20 R: TTC TCC CGT AAC ACT CGT CA	52	(GT)12	G01598
MCW043	F: TGA CTA CTT TGA TAC GCA TGG AGA R: CAC CAA GTA GAC GAA AAC ACA TTT	55	(T)21	L40073
MCW005	F: ACC TCC TGC TGG CAA ATA AAT TGC R: TCA CTT TAG CTC CAT CAG GAT TCA	55	(TG)14	L40048
MCW049	F: AGC GGC GTT GAG TGA GAG GAG CGA R: TCC CCA ACC CGC GGA GAG CGC TAT	55	(GCA)11	L40077

#### Mikrosatelit Allel Dağılımı

Atak-S ve Isa Brown için yapılan SSR taraması sonucunda toplam 85 adet allel tespit edilmiştir. Her iki hibrit için allel ortalaması  $14.16 \pm 0.02$  olarak bulunmuştur (Tablo 1). Yapılan SSR skorlama sonucunda Atak-S hibritlerinde SSR markörleri olan ADL136 için 12, ADL158 için 9, ADL176 için 6, MCW043 için 6, MCW005 için 10, MCW049 için 5 allel elde edilmiştir (Tablo 2). Isa Brown'da ise ADL136 için 8, ADL158 için 7, ADL176 için 4, MCW043 için 6, MCW005 için 8, MCW049 için 4 allel elde edilmiştir (Tablo 2).

#### Genetik Çeşitlilik

Beklenen heterozigotluk ( $H_e$ ) ve PIC tahminleri, her bir alt popülasyonda ve hibritler arasındaki her lokus için allel frekansı verileri kullanılarak elde edildi. Ortalama  $H_e$  değeri  $0.61 \pm 0.05$ , ortalama PIC değeri  $0.62 \pm 0.01$  ve ortalama  $F_{is}$  değeri  $0.25 \pm 0.05$  olarak bulundu (Tablo 1). En yüksek  $H_e$  değeri 0.534 (ADL136), en düşük  $H_e$  değeri ise 0.210 (MCW043) olarak tespit edildi. Ayrıca ortalama  $H_e$  değeri Atak-S tavuklarında  $0.35 \pm 0.76$ , Isa Brown tavuklarında ise  $0.26 \pm 0.68$  olarak belirlendi. PIC değeri en yüksek 0.48 (MCW005), en düşük 0.20 (MCW049) olarak bulundu (Tablo 3).

**Tablo 2:** İki tavuk hibritinde kullanılan 6 adet marköre ait tanımlayıcı bilgiler

**Table 2:** Descriptive informations of 6 markers used in two chicken hybrids

Lokus	Allel büyüklüğü (bp)	Allel sayısı	$H_e$	PIC	$F_{is}$
ADL136	120-168	20	0.789	0.72	0.313
ADL158	167-198	16	0.692	0.64	0.309
ADL176	172-193	10	0.564	0.53	0.215
MCW043	110-133	12	0.434	0.62	0.154
MCW005	208-256	18	0.672	0.82	0.320
MCW049	110-129	9	0.543	0.44	0.234
Mean±SE	-	$14.16 \pm 0.02$	$0.61 \pm 0.05$	$0.62 \pm 0.01$	$0.25 \pm 0.05$

**Tablo 3:** Atak-S ve Isa Brown alt popülasyonları içerisinde genetik çeşitlilik  
**Table 3:** Genetic diversity within the subpopulations of Atak-S and Isa Brown

Lokus		Atak-S	Isa Brown
ADL136	bp	120-168	120-168
	N	12	8
	$H_o$	0.429	0.372
	$H_e$	0.534	0.355
	PIC	0.42	0.30
ADL158	bp	167-198	167-198
	N	9	7
	$H_o$	0.423	0.267
	$H_e$	0.445	0.247
	PIC	0.40	0.34
ADL176	bp	172-193	172-193
	N	6	4
	$H_o$	0.253	0.249
	$H_e$	0.302	0.262
	PIC	0.29	0.24
MCW043	bp	110-133	110-133
	N	6	6
	$H_o$	0.221	0.220
	$H_e$	0.210	0.224
	PIC	0.30	0.32
MCW005	bp	208-256	208-256
	N	10	8
	$H_o$	0.435	0.256
	$H_e$	0.390	0.282
	PIC	0.48	0.34
MCW049	bp	110-129	110-129
	N	5	4
	$H_o$	0.245	0.201
	$H_e$	0.265	0.238
	PIC	0.24	0.20
Mean $\pm$ SE	N $\pm$ SE	8 $\pm$ 0.76	6 $\pm$ 0.16
	$H_o$ $\pm$ SE	0.33 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.08
	$H_e$ $\pm$ SE	0.35 $\pm$ 0.76	0.26 $\pm$ 0.68
	PIC $\pm$ SE	0.35 $\pm$ 0.5	0.29 $\pm$ 0.05

Not: bp, allel büyüklüğü; N, allel sayısı;  $H_o$ , gözlenen heterozigotluk;  $H_e$ , beklenen heterozigotluk; PIC, Polimorfizm bilgi içeriği.

Çalışmada kullanılan SSR verileri Dice coefficient and unweighted neighbor-joining algorithm kullanılarak oluşturulan dendrogram analizi ve matris uzaklığı için kullanıldı. Mantel test sonuçları dendrogram ve matris uzaklığı arasında yüksek oranda korelasyon olduğunu gösterdi ( $r = 0.96$ ). Her iki hibrit için SSR markörlerine dayalı genetik farklılık analizinde SSR markörleri arasında istatistikî farklılıklar bulunmuştur. Ayrıca her iki hibrit üç farklı gruba ayrılmıştır (Şekil 1). Bu durum

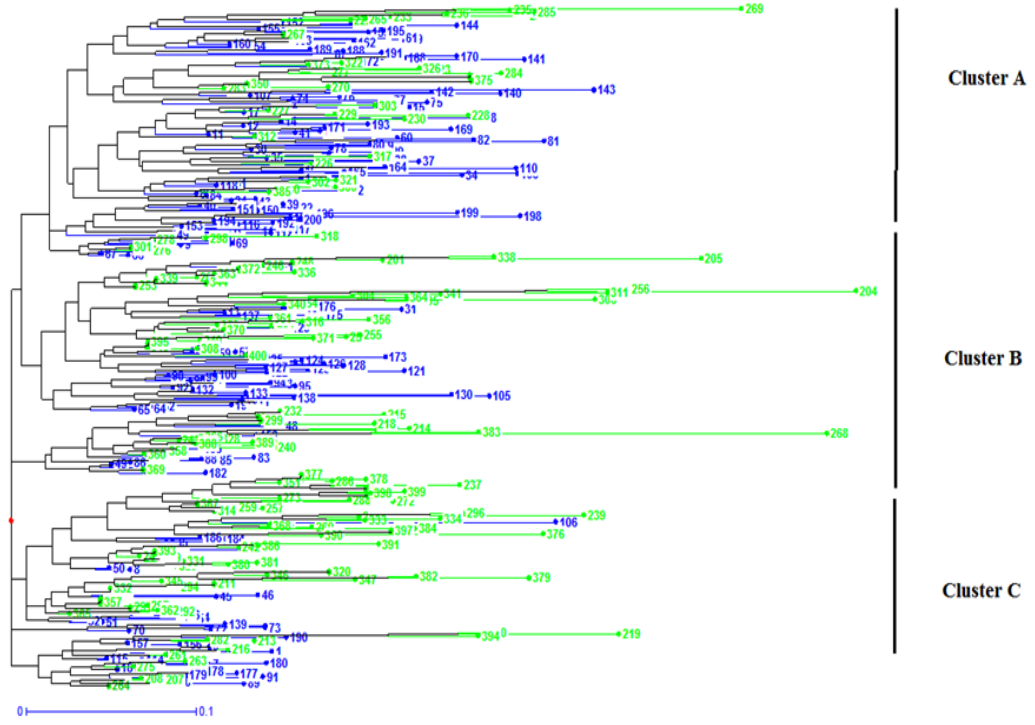
iki hibrit arasında SSR markör bakımında farklılıkların olduğunu göstermektedir.

#### Popülasyon Yapısı ve Genetik Orijinler

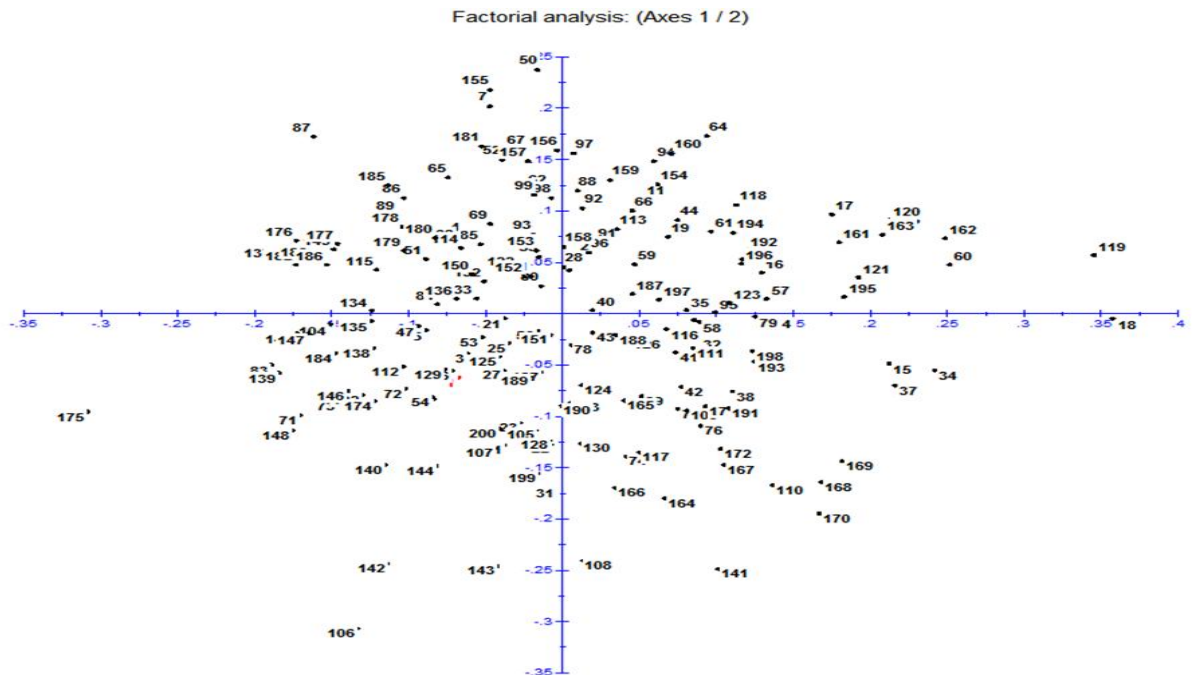
Popülasyon yapısı SSR verilerine göre incelendi ve yukarıdaki sonuçlara benzer veriler elde edildi. Sonuçlara göre veriler  $K=2$  modeline göre en iyi şekilde tanımlandı ve üç farklı sub-popülasyon grubu elde edildi. Belirlenen sub-popülasyonların treshhold değerinin  $p \geq 0.6$  olduğu gözlemlendi.

Populasyonların genetik orijinleri PCoA'ya göre belirlendi. Yapılan faktöriyel analiz sonucu iki

hibritte de SSR markörlerinin farklı frekanslarda allel oluşturduğu gözlemlendi (Şekil 2 ve Şekil 3).

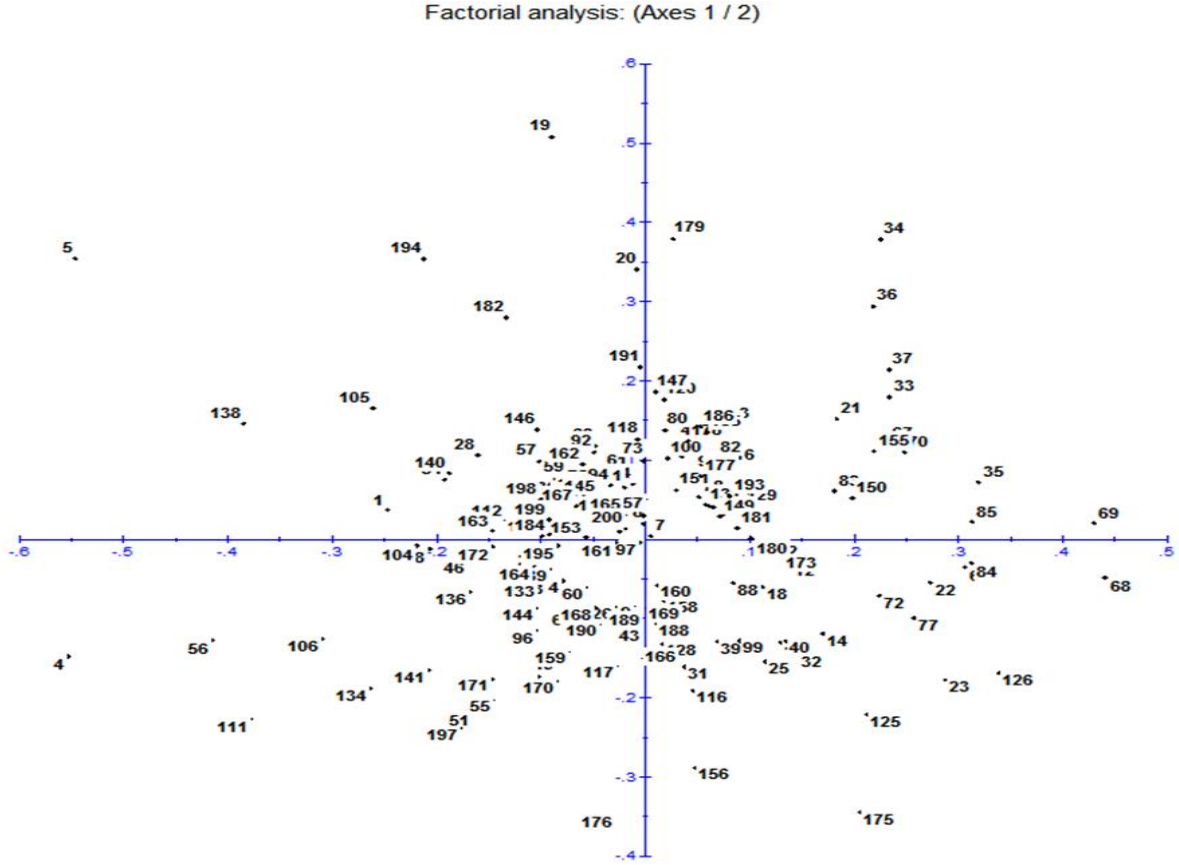


**Şekil 1:** Isa Brown ve Atak-S hibritleri için oluşturulan Unweighted neighbor-joining dendrogram (Yeşil; Atak-S, Mavi; Isa Brown). Cluster A; Isa Brown, Cluster B; Atak-S, Cluster C; Isa Brown + Atak-S.  
**Figure 1:** Unweighted neighbor-joining dendrogram (Green; Atak-S, Blue; Isa Brown) for Isa Brown and Atak-S hybrids. Cluster A; Isa Brown, Cluster B; Atak-S, Cluster C; Isa Brown + Atak-S.



Şekil 2: SSR verilerine dayanan PCoA analizi (Isa Brown).

Figure 2: PCoA analysis based on SSR data (Isa Brown).



Şekil 3: SSR verilerine dayanan PCoA analizi (Atak-S).

Figure 3: PCoA analysis based on SSR data (Atak-S).

## TARTIŞMA

### Mikrosatellit Allel Dağılımı

Bu çalışma, önemli ticari hibritlerden olan Atak-S ve Isa Brown yumurtacı hibritlerinin karşılaştırmalı popülasyon yapısını ve bazı mikrosatellitler ile yumurta verimi ve ağırlığı arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymuştur. Biz bu çalışmada genomik çeşitlilik ve tavukların evrim geçmişi çıkarmak için genom kaynaklı mikrosatellit markörlerini kullandık. Mikrosatellit lokusu, eğer uygun PIC değerlerine sahip Mendel kalıtımına benzer koşulları, farklı kromozom /bağlantı gruplarındaki varlıkları ve bağımsız çeşitlilik gibi koşulları yerine getiriyorsa, bir popülasyonun bağımsız bir evrimsel geçmişi temsil eder. Bu çalışmada kullanılan ve tüm koşulları sağlayan lokuslar, biyoçeşitlilik ve popülasyon genetiği çalışmaları için uygun bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada evrensel olarak kabul edilmiş polimorfik lokus setine dayanan, oldukça kararlı, tekrarlanabilir ve yüksek çözünürlüklü bir yöntem kullanıldı.

Bu çalışmada önceki raporlara kıyasla çok daha fazla mikrosatellit değişikliği olduğu ortaya çıktı (Crooijmans ve ark. 1996a, Crooijmans ve ark. 1996b, Rajkumar ve ark. 2008, Kaya and Yıldız 2008). Bu çalışmada elde edilen allellerin sayısı ve büyüklük aralıkları diğer araştırmacılar tarafından bildirilenlerden daha yüksek bulundu (Vanhala ve ark. 1998, Romanov and Weigend 2001, Shahbazi ve ark., 2007, Kaya and Yıldız 2008). Osman ve ark. (2006) yaptıkları bir çalışmada Japon ve yabancı tavuk popülasyonlarında her bir lokus için 18 allel tespit etmiştir. Pirany ve ark. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada MCW005 için 27 adet allel tespit edilmiştir. Daha önce Türkiye’de yetiştirilen ve yerli tavuk hibritlerinden olan denizli ve gerze tavuklarına üzerine yapılan bir çalışmada ADL 136 için 12, ADL 158 için 5 ve ADL 176 için ise 9 adet allel bulunmuştur (Kaya and Yıldız 2008). Hindistanda ki tavuk popülasyonları üzerine yapılan bir çalışmada ADL 136 için 21, ADL 158 için 10, ADL 176 için 18, MCW043 için 13, MCW005 için 26 ve MCW049 için 10 adet allel tespit edilmiştir (Rajkumar ve ark. 2008). Allel sayısındaki ve allel büyüklüğündeki farklılıklar, yüksek derecede



genetik varyasyon içeren birbirleriyle bağımsız olan yerel popülasyonların ve ticari türlerin genotiplendirilmesinden kaynaklı olabilir. Büyük alel büyüklüğü dağılımı ve lokus sayısı içeren bu çalışma, farklı tavuk popülasyonların verimlerini arttırmaya yönelik yapılacak olan moleküler ıslah üzerine çalışmalara yarar sağlayacaktır.

### Genetik Çeşitlilik

Popülasyonlardaki heterozigotluk tahminleri, belirlenen allel sayısında ve polimorfik bilgi içeriğinde belirgin bir heterojenlik gösteren bir dizi markör üzerine kurulmuştur. Çok değişken ve daha az değişken mikrosatellitlerden oluşan bir karışımın kullanılması, aşırı değişken lokusların kullanılması durumunda oluşabilecek genetik değişkenliğin aşırı tahmin edilmesi tehlikesini azaltacaktır (Wimmers ve ark. 2000). Bu çalışmada tüm lokuslar için yüksek  $H_e$  gözlemlendi ve ortalama lokuslar için  $H_e$  değeri  $0.61 \pm 0.05$  olarak bulundu (Tablo 2). İki hibrit arasında  $H_e$  ise; Atak-S'de  $0.35 \pm 0.76$ , Isa Brown'da  $0.26 \pm 0.68$  olarak bulundu (Tablo 3). Bu sonuç, Atak-S hibritindeki genetik çeşitliliğin Isa Brown hibritine göre daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Kore yerli tavuklarında yapılan bir çalışmada genetik çeşitliliği gösteren  $H_e$  değerinin  $0.63$  olduğu (Kong ve ark. 2006), Afrika, Asya ve Güney Amerika yerli tavuklarında yapılan bir çalışmada  $H_e$  değerinin  $0.45-0.67$  arasında olduğu (Wimmers ve ark. 2000), Çin yerli tavuklarında yapılan bir çalışmada ise  $H_e$  değerinin  $0.63-0.86$  arasında olduğu (Shahbazi ve ark. 2007) rapor edilmiştir. Beklenen heterozigotluğun değişimi, konum, örnek büyüklüğü, popülasyon yapısı ve mikrosatellit belirteçlerinin kaynakları arasındaki farklılıklara bağlı olabilir.

Ortalama PIC, allel fragmanlarının polimorfizmini ölçmek için ideal bir indekstir. Botstein ve ark. (1980)'na göre  $PIC > 0.50$ , oldukça bilgilendirici bir lokusu,  $0.50 > PIC > 0.25$ , orta düzey bilgilendirici bir lokusu, ve  $0.25 > PIC$  düşük bilgilendirici bir lokusu ifade eder. Bu çalışmada PIC ortalaması  $0.62 \pm 0.01$  olarak bulundu. Bu sonuç Atak-S ve Isa Brown hibritlerinde kullanılan mikrosatellit belirteçlerinin yüksek oranda bilgilendirici olduğunu göstermektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda ADL0158, ADL0171, ADL0176, ADL0210, ve ADL0267 mikrosatellitlerinin yüksek seviyede bilgilendirici olduğu tespit edilmiştir (Wimmers ve ark. 2000, Kaya and Yıldız 2008).

### SONUÇ

Bu çalışmada, sınırlı sayıda lokus ve analiz edilen numuneler olsa bile, Atak-S ve Isa Brown alt popülasyonlarını tanımlamak ve karşılaştırmak için moleküler belirteç olarak mikrosatellit primerlerinin kullanılabilirliği gösterilmiştir. Çalışmadan elde edilen veriler, Atak-S ve Isa Brown hibritleri içindeki ve arasında genetik çeşitliliklerin iyi korunmuş

olduğunu ileri sürmektedir. Diğer bir ifadeyle çalışmada kullanılan SSR markörlerinin, yumurta yönlü yerli hibritlerimizin performansının yükseltilmesi, kapasite ve üretim düzeylerinin artırılması üzerine yapılacak moleküler ıslah çalışmalarında kullanılması faydalı olacaktır. Ayrıca, mikrosatellit analizi ile tahmin edilen Atak-S ve Isa Brown hibritleri hakkındaki bilgiler, gelecekteki genetik varyasyon araştırmalarını tasarlamak ve koruma stratejileri geliştirmek için hedeflerin belirlenmesinde rehber olarak yararlı olabilir.

### TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın moleküler kısımları Atatürk Üniversitesi Doğu Anadolu Yüksek Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezinde (DAYTAM) yapılmıştır.

### KAYNAKLAR

- Bakhtiarizadeh MR, Arefnejad B, Ebrahimie E, Ebrahimi M.** Application of Functional Genomic Information to Develop Efficient EST-SSSR For The Chicken (*Gallus gallus*). Genet Mol Res. 2012; 11(2): 1558-74.
- Balcı F, Petek M, Başpınar H, Oğan M.** Farklı genotipten yumurtacı tavukların eşdeğer çevre koşullarında karşılaştırmalı verim özellikleri, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2003; 29 (1): 9-20.
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. Am J Hum Genet. 1980; 32(3): 314-31.
- Büyükbekci İ, Kadioğlu B.** Yumurta Verim Yönlü Yerli Yerli ve Dış Kaynaklı Hibritlerin Çeşitli Performanslarının Karşılaştırılması. Gelişme Raporu, T.C. Tarım ve Köyşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü 1991 Yılı Faaliyet raporu. 1992 Ankara.
- Choi W, Shin GW, Hwang HS, Pack SP, Jung GY, Jung GY.** A Multiplex Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Method Using Ligase-Based Mismatch Discrimination and CE-SSCP. Electrophoresis. 2014; 35(8): 1196-203.
- Crooijmans RPMA, Groen AF, Van Kampen AJA, Van der Beek S, Van der Poel JJ, Groenen MAM.** Microsatellite polymorphism commercial broiler and layer lines estimated using pooled blood samples. Poult. Sci. 1996a; 75: 904-909.
- Crooijmans RPMA, van Ders PAM, Strijk JA, Van der Poel JJ, Groenen MAM.** Preliminary linkage map of the chicken



- (*Gallus domesticus*) genome based on microsatellite markers: 77 new markers mapped. *Poult. Sci.* 1996b; 75: 746-754.
- Çelik, İ.** İkili (PR) Yerli Kahverengi Hibritlerle Yabancı Kahverengi Hibritlerin Çeşitli Verim Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması. Gelişme raporu, T.C. Tarım ve Köyüşleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü Tavukçuluk Araştırma Enstitü Müdürlüğü 1991 Yılı Faaliyet raporu. 1992 Ankara.
- Durmuş İ, Sarıca M, Aktan S, Yıldız T, Kahraman Z, Ertaş S.** Geliştirilmekte Olan Yerli Ticari Yumurtacı Hibritlerin Verim Özelliklerinin Belirlenmesi, *Tavukçuluk Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 2009; 8(1): 5-9.
- Erensayın C.** Bilimsel-Teknik-Pratik Tavukçuluk (Et Tavukçuluğu Ve Kuluçka). Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti, Ankara. 2000a; 1(183): 561.
- Erensayın C.** Bilimsel-Teknik-Pratik Tavukçuluk (Yumurta Tavukçuluğu). Nobel Yayın Dağıtım Ltd. Şti, Ankara. 2000b; 2(184): 472.
- Fathel AN, Elibol O.** Yerli ve Dış Kaynaklı Kahverengi Yumurtacı Hibritlerin Verim Özellikleri Bakımından Karşılaştırılması, *Tarım Bilimleri Dergisi.* 2006; 12 (2): 182-187.
- Karaçay, N.** Yerli ve Dış Kaynaklı Yumurtacı Hibritlerin Birinci ve İkinci Verim Dönemi Performansları Bakımından Karşılaştırılması. 19 Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 2000.
- Kaya M, Yildizi MA.** Genetic diversity among Turkish native chickens, Denizli and Gerze, estimated by microsatellite markers. *Biochem. Genet.* 2008; 46: 480-491.
- Kim KW, Chung HK, Cho GT, Ma KH, Chandrabalan D, Gwag JG, Kim TS, Cho EG, Park YJ.** PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing allele mining sets. *Bioinformatics* 2007; 23: 2155-2162.
- Kong HS, Oh JD, Lee JH, Jo KJ, Sang BD, Choi CH, Kim SD, Lee SJ, Yeon SH, Jeon GJ, Lee HK.** Genetic variation and relationships of Korean native chickens and foreign breeds using 15 microsatellite markers. *Asian Aust J Anim Sci.* 2006; 19(11): 1546–1550.
- Matsuoka Y, Vigouroux Y, Goodman MM, Sanchez JG, Buckler E, Doebley J.** A single domestication for maize shown by multilocus microsatellite genotyping. *PNAS.* 2002; 99(9): 6080–6084.
- Nei M, Li WH.** Mathematical Model For Studying Genetic Variation in Terms of Restriction Endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA.* 1979; 76: 5269–5273.
- Osman SAM, Sekino M, Nishihata A, Kobayashi Y, Takenaka W, Kinoshita K, Kuwayama T, Nishibori M, Yamamoto Y, Tsudzuki M.** The genetic variability and relationships of Japanese and foreign chicken assessed by microsatellite DNA profiling. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2006; 19: 1369-1378.
- Pirany N, Romanov MN, Ganpule SP, Devegowda G, Prasad DT.** Microsatellite analysis of genetic diversity in Indian chicken populations. *J. Poult. Sci.* 2007; 44: 19-28.
- Rajkumar U, Gupta BR, Reddy AR.** Genomic Heterogeneity of Chicken Populations in India. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2008; 21(12): 1710 – 1720.
- Rohlf FJ.** NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.02. Exeter Software, Setauket, New York, 1998.
- Romanov MN, Weigend S.** Analysis of genetic relationships between various populations of domestic and red jungle fowl using microsatellite markers. *Poult. Sci.* 2001; 80: 1057-1063.
- Saal B, Wricke G.** Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale*L.) (1999) *Genome.* 1999; 42(5): 964-972.
- Shahabazi S, Mirhossini SZ, Romanov MN.** Genetic diversity in five Iranian native chicken populations estimated by microsatellite markers. *Biochem. Genet.* 2007; 45: 63- 75.
- Türkoğlu M, Arda M, Yetişir R, Sarıca M, Altan A, Erensayın C.** Tavukçuluk Bilimi (Yetiştirme Ve Hastalıklar), I.Baskı Bey Ofset, Matbaacılık Ltd.Şti, Ankara. 2004; 489.
- Vanhala T, Tuiskala-Haavisto M, Elo K, Vilkki J, Maki TA.** Evaluation of genetic variability and genetic distances between eight chicken lines using microsatellite markers. *Poult. Sci.* 1998; 77: 783-790.
- Wenz H, Robertson JM, Menchen S, Oaks F, Demorest DM, Scheibler D, Rosenblum BB, Wike C, Gilbert DA, Efcavitch JW.** High-Precision Genotyping By Denaturing Capillary Electrophoresis. *Genome Res.* 1998; 8(1): 69-80.
- Wimmers K, Ponsuksili S, Hardge T, Valle-Zarate A, Mathur PK, Horst P.** Genetic distinctness of African, Asian

and South American local chickens.  
Anim Genet. 2000; 31(3): 159-65.

**Yiğitoğlu E, Testik A.** Atak-S Yumurtacı Tavuk Hibritinin Çukurova (Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma Ve Uygulama iftliđi) Koşullarında Performansının Saptanması. . Fen Bilimleri Enstitüsü. 2008; 18: 2.

## Köpeklerde Dış Kulak Yolu Hastalıklarının Video-Otoskopik, Ultrasonografik ve Radyografik Yöntemlerle Belirlenmesi<sup>#</sup>

Nusret APAYDIN\*<sup>1</sup>, Özge HASANDAYIOĞLU<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri

<sup>#</sup>Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri TSY-11-3492 nolu proje ile desteklenmiştir.

\*Corresponding author e-mail: napaydin@erciyes.edu.tr

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı; köpeklerde dış kulak yolu hastalıklarının radyolojik, ultrasonografik ve video-otoskopik yöntemler uygulanarak belirlenmesi, bu yöntemlerin karşılaştırmalarının yapılarak avantaj ve dezavantajlarının saptanmasıdır. Çalışmanın materyalini; kulak hastalığı olan farklı ırk, yaş ve cinsiyetteki 31 köpek oluşturdu. Hastalar gerekli olduğunda sedasyon ya da genel anestezi uygulanarak muayene edildi. Her olgunun video-otoskopik, ultrasonografik ve radyografik muayeneleri yapıldı. Elde edilen veriler ve görüntüler kaydedildi. Video-otoskop ile yapılan muayenede 29, radyolojik görüntüleme 3, ultrasonografi sonuçları değerlendirildiğinde ise 25 olgunun kesin tanısı yapıldı. Sonuç olarak; köpeklerde dış kulak yolu hastalıklarının kesin tanısında video-otoskopik yöntemin diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu, ultrasonografik yöntemin kendi başına yeterli olamayacağı, radyografik yöntemin ise spesifik olgularda uygulanabileceği belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** Köpek, dış kulak yolu, video-otoskopi, ultrasonografi, radyografi

### Determination of External Ear Canal Problems Using Radiographic, Ultrasonographic and Video-Otoscopy Methods

#### ABSTRACT

The purpose of this study is the determination of external ear canal diseases in dogs by applying radiological, ultrasonographic, and video-otoscopic methods, comparison of these methods, and their advantages and disadvantages. The material of the study consisted of 31 dogs of different breed, age, and sex with ear diseases. Patients were examined by sedation or general anesthesia when necessary. Each case was examined with video-otoscopy, ultrasonography and radiology. All the images and data from these examinations were recorded. Twenty-nine cases with video-otoscopic examination, 3 cases with radiological imaging, and 25 cases with ultrasound findings were diagnosed with a definite diagnosis. As a result, it has been determined that the video-otoscopic method is more advantageous than the other methods in the definite diagnosis of external ear canal diseases in dogs. The ultrasonographic method can not be sufficient by itself and the radiographic method can be applied in specific cases.

**Key words:** Dog, external ear canal, video-otoscopy, ultrasonography, radiography

To cite this article: Apaydin N, Hasandayioğlu Ö. Köpeklerde Dış Kulak Yolu Hastalıklarının Video-Otoskopik, Ultrasonografik ve Radyografik Yöntemlerle Belirlenmesi. *Kocatepe Vet J.* (2018) 11(1): 63-69..

## GİRİŞ

Kulak, işitme ve denge organıdır (Dursun 2001). Kulak, havadaki titreşimleri beyine iletmeyi sağlayan ve bunu sinir ağlarının bir kodu içinde bulundurmak için geliştirilmiş bir duyu organıdır (Purves ve ark. 1997).

Köpek ve kedilerde en sık görülen kulak hastalığı olan otitis eksterna; dış kulak yolu epitelinin akut veya kronik yangısı olarak tanımlanmaktadır ve hastalığın etiyojisi ile ilgili pek çok araştırma yapılmıştır (Keskin ve ark 1999). Hastalığın köpeklerdeki insidansı, kedilerden daha yüksektir. Bunun muhtemel nedeninin köpeklerdeki anatomik predispozisyon olduğu bildirilmektedir (Keskin ve ark 1999, Stundert ve ark 1991, Rosychuk ve ark 1994). Otoskopik muayenede herhangi bir kitle veya yabancı cisimler aranacak ise, hasta otitis eksternalı olarak değerlendirilir. Bunun yanında, timpanik membranın da görüntülenip değerlendirilmesi gerekmektedir (Karabulut ve Han 2007, Samsar ve Akın 2000).

Kulak hastalıklarında radyografi çok sık başvuru muayene yöntemidir. Auricullar ve anular kırıkdağın kalsifikasyonundan şüphe edildiği durumlarda ve Unilateral ya da bilateral kulak yolu neoplazisi durumlarında kolaylıkla kullanılabilir. Kulak hastalıklarının tanısında radyografik pozisyon önemlidir. Diğer yöntemlerde olduğu gibi radyografik inceleme içinde anestezi yapılması gerek uygun pozisyonun sağlanması gerekse uygulama kolaylığı sağlanması açısından önemlidir (Alkan 1999, Zur 2005, Kealy ve McAllister 2005).

Kulak kanalı ve kulak zarının otoskopi muayenesi her zaman sağlıklı bilgiler sunmamaktadır. Kesin tanıda video-otoskop, direkt radyografi, ve kanalografiden yararlanılmakla birlikte, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntüleme de yararlanılmaktadır (Karabulut ve Han 2007, Dickie ve ark 2003, Kneissi ve ark 2004, Öztürk ve ark 2000). Son zamanlarda bulla timpanika, dış kulak yolu ve kulak zarının görüntülenmesinde ultrasonografiden de yararlanılabileceği düşünülerek, kadavra üzerinde bulla timpanikanın görüntülenmesi ve canlı köpeklerde dış kulak yolu ve kulak zarının görüntülenmesi tanımlanmıştır (Dickie ve ark 2003). Özellikle dış kulak yolu dar olan hayvanlarda kulak zarı otoskopi tam olarak görüntülenemeyebilir. Kulak zarı perforasyonlarının tanısında ultrasonografik muayene önemli bir tekniktir. Ucuz, çabuk uygulanabilen, hasta ve hekim açısından noninvaziv bir teknik olan ultrasonografik muayenenin dış kulak yolundaki yabancı cisimlerin, tümörlerin, kulak zarı perforasyonlarının ve diğer kulak hastalıklarının tanısında kullanımı uygundur (Choi ve Chang 2006).

Ultrasonografi tekniği; muayene edilen hayvan ve hekim açısından tehlike taşıması, hastayı rahatsız

etmemesi, kolay ve çabuk uygulanabilir olması, iyonizan olmaması ve dokulara nüfuz etmemesi ile radyografi, bilgisayarlı tomografi ve izotopik tarama yöntemlerinden üstündür (Samsar ve Akın 2000).

Eğer otoskopik bulgular bir video kamera ile görüntülenirse, video-otoskopi olarak adlandırılmaktadır (Rosychuk 2005, Cole 2004). Kulak muayenesi için kullanılan çok çeşitli sayıda ve türde video-otoskop bulunmaktadır (Rosychuk 2005). Yapılan birçok çalışmada; köpeklerin otitis eksternalarının tanısı için bir yöntem olarak video-otoskopinin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınmıştır (Maniscalco ve ark 2009).

Video-otoskop köpek ve kedi kulaklarında kullanım için özel olarak tasarlanmış bir rijit endoskopik sistemdir. Bir video-otoskop ile dış kulak yolunun incelenmesi, orta kulağa, bullaya erişmek için miringotomi (kulak zarının çizilmesi) yapılabilir. Dış kulak kanalının temizliği, lezyonların belirlenmesi, aspirasyonu ve ilaçlaması yapılabilmektedir. Video-otoskop ile bu işlemler yapılırken genellikle sedasyon veya anestezi uygulanır. Muayene salonunda video-otoskop; hasta sahibine görüntülerle birlikte hastalığı anlatma ve yapılacak tedavi prosedürünü gösterme olanağı sunar (Gotthelf 2002).

Bu çalışma ile köpeklerde kulak hastalıklarının; radyografik, ultrasonografik ve video-otoskopik muayene yöntemleri ile belirlenmesi, elde edilen sonuçların değerlendirilmesi ile hangi yöntemin, hastalığın tanısında daha kolay ve uygulanabilir olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOD

Çalışmada; kulak şikayeti olan değişik yaş, cinsiyet ve ırktaki 31 adet köpek yer almıştır. Yapılan klinik muayene sonucunda dış kulak yolunda problem olduğundan şüphelenilen hayvanların ultrasonografik, radyolojik ve video-otoskopik muayeneleri yapılarak hastalıkların kesin tanısı konuldu. Ayrıca bu yöntemler karşılaştırıldı.

Hastalara tedavi protokolleri uygulandı. Ancak bu protokoller ve süreç ile ilgili bilgiler çalışmada yer almadı. Çalışma süresince köpekler kliniklerimizde hospitalize edilmedi.

Ultrasonografik görüntüleme de SonoSite® marka 180™ Plus model ultrason sistemi, Haiying® marka HY 230V model ultrason sistemi, Hasvet 838 marka ultrason sistemi kullanıldı. Çalışmamızda B-B/B mod veya 7 MHz konveks prob veya duruma göre transrektal prob kullanıldı.

Radyografik görüntüleme ise Poskom® marka PXP-40HF model 35mA portatif x-ray aygıtı ve alınan grafiler konica minolta® marka SRX-101 A model otomatik banyo cihazı kullanılarak işlendi. Ayrıca Profexray marka portatif röntgen aygıtı da kullanıldı. Portatif röntgen aygıtı ile çekilen filmler manuel banyo yöntemiyle görüntüldü.

Video otoskopik muayeneler için rijit endoskopi düzeneği olan Medamet® F-166 1CCD Endocam marka endoskopi aygıtı ve Medamet® T 905004 Model 250W Halojen Medikal Soğuk Işık kaynağı kullanıldı. Ayrıca Rosh marka EHEV1 model video otoskop da kullanıldı.

Ultrasonografik muayenede; üstte kalacak şekilde yan yatırılan köpeğin kulağı tüylerden arındırıldıktan sonra prob ile deri arasına jel sürülerek longitudinal ve transversal olarak tarandı. Çalışmamızda B-B/B mod 7 MHz konveks prob veya duruma göre transrektal prob kullanıldı.

Çalışmamızda köpeklerin agresiflik durumuna göre preanestezi uygulaması yapıldı. Çalışmada kullanılan köpeklerde radyolojik muayene için V/D ( ventro dorsal), lateral ve latero lateral baş bölgesinin hepsini kapsayacak çekimler uygulandı.

Video otoskopik (endoskopi ile otoskopi) muayene için hayvan sakin ise anestezi kullanılmadı ancak hayvan agrasif veya hiperaktif ise inhalasyon anestezisi ve katı anestezikler kullanılarak genel anestezide alındı. Premedikasyon için Rompun® (Xlazin HCL)(2 mg/kg dozunda) ya da Domitor® (Medetomidin 50 mikrogram/kg) kullanıldı. İndüksiyon için ise Alfamine %10 luk (ketamin HCL) kullanıldı. Video otoskopik muayeneler inhalasyon anestezisi altında yapıldı. Köpekler anestezi süresince moniterizasyona bağlı kaldı ve hemodinamik parametreler sürekli takip edildi.

Video otoskopik muayene sonrası anestezide son verilerek eksübe edilen köpekler yoğun bakım kafeslerine alınarak genel durumları takip edildi. Anesteziden çıkışları sağlandı.

Bütün video otoskopik, ultrasonografik ve radyografik verilerin toplanması ve kayıtların derlenmesi sonucunda hastalıkların teşhisi konuldu. Ayrıca ultrasonografik radyolojik ve video otoskopik tanı yöntemleri karşılaştırıldı.

Dış kulak yolunda veya kulak zarında yabancı cisim olgularında yabancı cisimi çıkarmak veya örnek almak için biopsi forceps kullanıldı.

## BULGULAR

Çalışmamızda; farklı yaş, ırk ve cinsiyet aralığındaki 31 dış kulak yolunda sorun olan köpeğin yapılan ultrason, röntgen ve video-otoskop muayeneleri sonrası hastalıklarının tanısı yapıldı (Tablo 1, Tablo 2)

Video-otoskop ile yapılan muayenede; 29 olgunun tanısı net olarak yapılırken, 1 olgunun kulak kepçesinde oluşan apseye bağlı dış kulak yolunun kapanması sonucu uygulama yapılamadı. Diğer 1 olguda ise radyolojik ve ultrasonografi muayenelerinde belirlenen kitlenin video-otoskop ile yapılan muayenesinde dış kulakta olmadığı görüldü. Video-otoskop ile yapılan muayenede; dış kulak yolundaki lezyonların, yabancı cisimlerin ve sıvı artışına bağlı oluşan bozuklukların net bir şekilde belirlenebildiği görüldü (Şekil 1). Ancak dış

kulak yolu daralmalarında uygulamanın kolay olmadığı, kanalın uygulamaya uygun genişlikte olduğu durumlarda uygulanabildiği belirlendi (Şekil 2). Bunun yanında dış kulak yolu çevresindeki lezyonların video-otoskop ile belirlenemediği saptandı. Video-otoskop ile dış kulak yolunun pratik bir şekilde muayene edilebileceği ve kesin teşhisin kolaylıkla yapılabileceği belirlendi (Şekil 3).



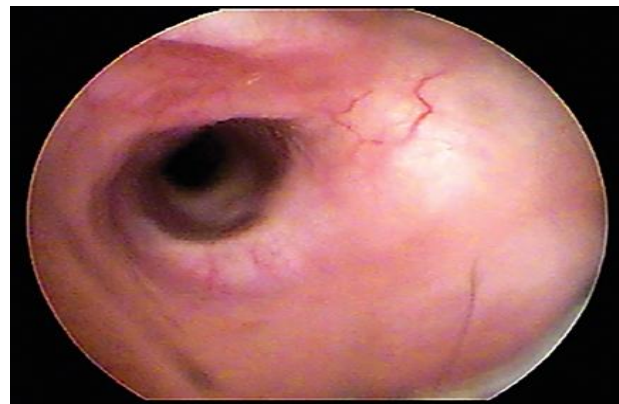
Şekil 1: Olgu no 1; Video-otoskop ile otitis eksternanın tanısı

Figure 1: Case number 1; Diagnosis of otitis externa with video-otoscope



Şekil 2; Olgu no 4: Olgunun video-otoskopik görüntüsünde sadece dış kulak yolunun darlığı belirlendi.

Figure 2; Case number 4: In the video-otoscopic view of the case only the narrowness of the external ear canal was determined



Şekil 3; Normal dış kulak yolunun video-otoskopik görüntüsü

Figure 3; Video-otoscopic view of normal external ear canal

**Tablo 1:** Teşhis yöntemlerinin doğruluk oranları  
**Table 1:** Accuracy rates of diagnostic methods

YÖNTEMLER	Teşhis edilen olgular		Teşhis edilemeyen olgular	
Ultrasonografi	25	%80.65	6	%19.35
Radyoloji	3	%9.99	28	%90.01
Video-otoskopi	29	%93.55	2	%6.45

**Tablo 2:** Görüntüleme yöntemlerinin hastalıkların teşhisine göre dağılımı

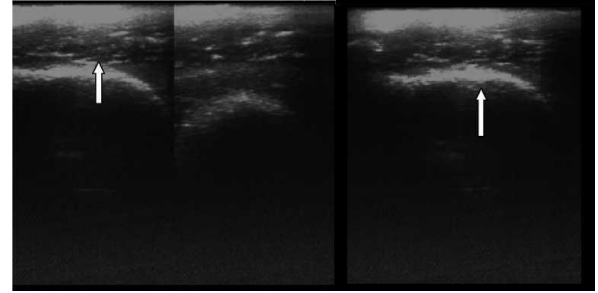
**Table 2:** Distribution of imaging methods according to diagnosis of diseases

Hastalıkların Tanısı	Olgu Sayısı	Video-otoskopi	Radyografi	Ultrasonografi
Otitis eksterna	14	14 +	14 -	13+ 1-
Dış kulak yolu stenozu	3	2 + 1 -	1+ 2-	3+
Tümör	1	1-	1+	1+
Kulak uyuzu	3	3+	3-	3-
Yabancı cisim	2	2+	2-	2-
Kulak yolu dilatasyonu	1	1+	1-	1+
Hemoraji	2	2+	2-	2+
Apse	2	2+	1+ 1-	2+
Anomali	1	1+	1-	1+
Tıkanıklık	1	1+	1-	1+
Kronik otitis eksterna	1	1+	1-	1+

(+) : Görüntüledi, (-) : Görüntülenemedi. (+): imaging, (-): not imaging

Bütün olguların radyografileri incelendiğinde sadece 3 olgunun radyografisinin de lezyonlar belirlenebildi. Bu 3 olgunun tanısı tek başına radyografi tekniği ile belirlenemedi. Video-otoskopi ve ultrasonografi teknikleri ile birlikte yapılan değerlendirme sonucu teşhis konuldu. Diğer olguların radyografilerinde ise hastalığın tanısı ile ilgili hiçbir görüntü alınmadı. Radyografi tekniği ile tek başına dış kulak yolu hastalıklarının teşhisinin yapılamayacağı anlaşıldı.

Ultrasonografi sonuçları değerlendirildiğinde; 25 olguda net görüntüleme sağlanırken, 3 olgunun tanısında (radyografi ile teşhis edilen olgular) yardımcı uygulama yöntemi olarak uygulandı. Diğer 3 olguda ise hastalık belirlenemedi. Ultrason muayenesi ile dış kulak yolunda hastalığa bağlı biriken sıvının varlığı, dış kulak yolunun daralması ya da genişlemesi ile çevresindeki lezyonlar görüntülenebilirken, yabancı cisimlerin belirlenemediği saptandı (Şekil 4).



**Şekil 4:** Olgu no 1: Otitis eksternanın tanısı; ultrasonografi ile olgunun dış kulak yolundaki değişikliklerin görüntülenmesi.

**Figure 4:** Case number 1: The diagnosis of otitis externa, displayed of changes in the external ear canal by ultrasound.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Köpeklerde dış kulak yolu hastalıkları ile çok sık karşılaşılır (Samsar ve Akın 2000, Rosychuk 2005, Zur 2005). Dış kulak yolunun ve kulak zarının görüntülenmesi ve hastalıkların tanısının konulmasında en sık kullanılan muayene şekli otoskopik muayenedir. Ancak bazı olgularda

ultrasonografi ve radyografinin de kullanıldığı araştırmalar bildirilmiştir. Ultrasonografi ve radyoloji kulak yolunun görüntülenmesi için yeterli değildir (Alkan 1999, Karabulut ve Han 2007). Otoskopik muayene; gelişen teknolojiye ayak uyduramamış bu nedenle de video otoskopi kullanılmaya başlamıştır (Kealy ve McAllister 2005, Maniscalco ve ark 2009, Gotthelf 2002). Veteriner kliniklerinde hasta portföyüne bakıldığında kulak hastalıkları sayısının yüksek olması, dış kulak yolu hastalıkları ile sıklıkla karşılaşılması iddiasını doğrulamaktadır. Bulgularımız; ultrasonografi ve radyografinin tek yöntem olarak yeterli olmadığı, birlikte kullanıldığında hastalığın tanısının konulmasında kolaylık sağladığı, ancak video-otoskop yönteminin uygulanması ile hastalığın tanısının kesin olarak yapılabildiği sonucunu gösterdi. Stenoz durumlarında video-otoskopi tek başına yeterli olmadığı çalışmada kullanılan diğer yöntemlerin de kullanılarak teşhisin konulması gerektiği görüldü.

Köpeklerde dış kulak yoluna yabancı cisim kaçması olayı ile sıklıkla karşılaşılır. Düşük kulaklı köpeklerde daha sık görülmektedir. Otlar kulak kepçesinden dış kulak yolunu takip ederek içeri girmektedirler. Anatomik olarak hafif L şeklinde devam eden dış kulak yoluna giren otlar kendi haline bırakıldığında tekrar dışarı çıkamazlar ve bu durumda kulak yolunu ve ilerleme durumuna göre membrana tympaniye hasara uğratırlar. Anatomik olarak normalde kulak yolunda bulunan sıvıların aneurob ortamda başta M.pachydermatitis olmak üzere staphylococcus spp, otodectes canis gibi etkenlerin dış kulak yolunda üreme alanı bulmaları sonucu otitis externa oluşmaktadır. Ayrıca membrana tympani de yabancı cisimlerden etkilenerek dejenerasyona uğrayabilmektedir (Rosychuk 2005, Samsar ve Akın 2002). Tüm kulak yangılarında ayrıntılı bir otoskopik muayene gereklidir. Membrana tympaninin bütünlüğü exudatın miktarı ve tabiatı kanaldaki yangının derecesi ektoparazitlerin ve yabancı cisimlerin varlığına dikkat edilmelidir (Alkan 1999). Çalışmamızda 2 olguda (10, 11 nolu olgular) yabancı cisim belirlendi (pisipisi otu). Tanı; video-otoskop ile yapıldı ve yabancı cisimler kulak içi forsepsi ile çıkarıldı. Bu olgularda ultrasonografi ve radyografi ile teşhis yapılamadı. Bunun yanında yabancı cisime bağlı olmayan otitis eksternali olgularımızda, biriken eksudat ve kulak yolunun kalınlaşmasına bağlı oluşan ekojenik alanların ultrasonografi ile belirlenmesi, bu yöntemin yabancı cisime bağlı olmayan otitis eksterna olgularında kolaylıkla kullanılabileceğini gösterdi. Karabulut ve Han; serum fizyolojik ile doldurdukları kulak yolunun ultrasonografi ile belirlenebileceğini ifade etmişlerdir. Yabancı cisim olan olgularımızda ultrasonografik yöntem ile teşhis yapılamamasının nedeni; dış kulak yolunda yangıya bağlı eksudat

artışının olmaması olarak değerlendirildi.

Dış kulak kanalı ve kulak zarının otoskopik değerlendirilmesi otitis eksternali olan hayvanlarda yapılan ilk tanı yöntemidir. Bazı durumlarda, tam otoskopik muayene ile ilk görüntüleme mümkün değildir ve hayvan dış kulak yolunu ve kulak zarını görmek için yıkamak gerekli olabilir. Otoskopik muayenede herhangi bir kitle veya yabancı cisimler aranacak ise, hasta otitis eksternali olarak değerlendirilir. Bunun yanında, timpanik membranın da görüntülenip değerlendirilmesi gerekmektedir (Alkan 1999). Olgularımızın bazılarında, video-otoskop ile dış kulak yolunun ve kulak zarının görüntülenebilmesi için yıkama işlemi yapıldı. Bu işlem kolay ve pratik bir şekilde gerçekleştirildi. Video-otoskop üzerine monte edilebilen flaş ve aspirasyon aparatı ile yıkamak için kulak yoluna bir yandan serum fizyolojik verilirken diğer taraftan aspire edilerek dış kulak yolunun irrigasyonu sağlandı. Irrigasyon ile çıkarılamayan kitleler yabancı cisim forsepsi ile çıkarıldı. Daha sonra dış kulak yolunun ve kulak zarının görüntülenmesi yapıldı. Yaptığımız işlem ve sonuçlar literatür bilgileri desteklemektedir.

Radyografi küçük hayvan veteriner hekimliğinde organ ya da dokuların görüntülenmesinde ve hastalıkların tanısında vazgeçilmez bir görüntüleme tekniği olarak yıllardır veteriner hekimlikte kullanılan bir tekniktir. Ancak yumuşak doku ve iç organların görüntülenmesinde bu teknik için aynı düşünceleri söylememiz mümkün olmamakla birlikte, radyografik muayene ile hastalıkların kesin tanısı yapmanın zor olduğu, diğer görüntüleme tekniklerinden de yararlanılması gerektiği bilinmektedir. Bu nedenle radyografi tekniğinin hastalıkların tanısı için yeterli bir teknik olmadığı düşünülmektedir (Alkan 1999). Çalışmamızdaki 31 olgunun 28 tanesinde (% 90) radyolojik tanı yönteminden yararlanılamadığı belirlendi. Radyografik görüntüleme ile dış kulak yolu hastalıklarının kesin tanısının mümkün olmadığı, diğer görüntüleme yöntemlerinden de yararlanılması gerektiği anlaşıldı.

Ultrasonografi, fiziksel muayene ve radyografik muayene ile elde edilen bilgilere ek bilgiler sağlar. Bir hastalığın tanısında ultrasonografi tek başına yeterli olmayabilir (Kealy ve McAllister 2005). Kulak kanalı ve kulak zarının otoskopi muayenesi her zaman sağlıklı bilgiler sunmamaktadır. Kesin tanıda video-otoskop, direkt radyografi, ve kanalografiden yararlanılmakla birlikte, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans görüntülemeye de yararlanılmaktadır (Karabulut ve Han 2007, Dickie ve ark (2003), Kneissi ve ark 2004, Öztürk ve ark 2000). Son zamanlarda bulla timpanika, dış kulak yolu ve kulak zarının görüntülenmesinde ultrasonografiden de yararlanılabileceği düşünülerek, kadavra üzerinde bulla timpanikanın görüntülenmesi ve canlı köpeklerde dış kulak yolu



ve kulak zarının görüntülenmesi tanımlanmıştır (Karabulut ve Han 2007). Özellikle dış kulak yolu dar olan hayvanlarda kulak zarı otoskopi ile tam olarak görüntülenemeyebilir. Kulak zarı perforasyonlarının tanısında ultrasonografik muayenenin önemi aşikardır (Choi ve Chang 2006). Ucuz, çabuk uygulanabilen, hasta ve hekim açısından noninvaziv bir teknik olan ultrasonografik muayenenin dış kulak yolundaki yabancı cisimlerin, tümörlerin, kulak zarı perforasyonlarının ve diğer kulak hastalıklarının tanısında kullanımı uygundur (Alkan 1999, Samsar ve Akın 2000). Tanısı konulan 31 olgunun 25 tanesinin de (%80) ultrasonografik yöntemle değerlendirildi. Ancak tek başına bu yöntemin yeterli olmayacağı, diğer görüntüleme yöntemleri ile birlikte uygulandığında dış kulak yolu hastalıklarının tanısında kesin tanı için kullanılabilirliği belirlendi. Rijit endoskoplar veteriner hekimlikte otoskop, dişi kedi ve köpeklerde sistoskop, rinoskop, kolonoskop, özefagoskop ve gastroskop olarak kullanılır. Eğer otoskopik bulgular bir video kamera ile dökümente edilirse bu, video-otoskopi olarak adlandırılır. Video-otoskop ile yapılan otoskopinin avantajı, tüm anuler bölgeyi içine alacak şekilde timpanik membranın tamamının görülebilmesidir. Dış kulak yolu ve timpanik membrandaki anatomi ve patolojiyi öğrenmede en pratik ve etkili metottür. Video destekli otoskopi, otoskopiye bağlı teşhiste beceriyi arttırmada yararlı bir tekniktir (Cole 2004, Rosychuk 2005, Alkan 1999). Köpeklerde hastalıkların %25 i kedilere ise %7 si kulak kaynaklıdır ve doğru teşhis tedavi veteriner klinikleri için günümüzde çok önemlidir. Video-otoskop ile veteriner hekimlikte kulağın daha iyi muayene edilebilme olanağı elde edilmiştir. Kulak hastalığının fiziki muayene sırasında hasta sahibi ve veteriner hekim video-otoskop ile ekranda sorunu gösterebilmektedir. Birçok kulak hastalıkları video-otoskopun yüksek büyütme ve geliştirilmiş aydınlatma özelliğinden dolayı kolaylıkla tespit edilebilir (Gotthelf 2002). Çalışmamızda rijit endoskop kullanıldı. Uygun ekipmanın takılması ile cihaz video-otoskop haline getirildi. Çalışmamızdaki olguların % 94 de hastalığın tanısı video-otoskop ile yapıldı. Bu nedenle video-otoskop her yönü ile dış kulak yolu hastalıklarının tanısında kolaylıkla uygulanabilecek bir görüntüleme metodu olarak değerlendirildi. Bir video-otoskop ile dış kulak yolunun muayenesi, orta kulağa, bullaya erişmek için, miringotomi için, dış kulak yolunun temizliği, lezyonların belirlenmesi, aspirasyonu ve ilaçlaması yapılabilmektedir. Video-otoskop ile bu işlemler yapılırken genellikle sedasyon veya genel anestezi uygulanır (Gotthelf 2002). Olgularımıza video-otoskop uygulaması inhalasyon anestezisi ve katı anestezi altında yapılmıştır. Hastaların anestezi süresince moniterizasyona bağlı olarak

hemodinamik parametreleri sürekli takip edildi. Yapılan birçok çalışmada (Maniscalco ve ark 2009, Gotthelf 2002); köpeklerin otitis eksternalının tanısı için bir yöntem olarak video-otoskopinin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınmıştır. Video-otoskopi; lezyonlara göre kulak hastalıklarının tanısında kullanılan ideal tanı yöntemi olduğu konusunda pek çok bilim adamları arasında görüş birliği bulunmaktadır (Maniscalco ve ark 2009). Çalışmamızın 31 olgusundan 15 olgusunu otitis eksterna oluşturmaktadır. Bu olguların hepsinde kesin tanı video-otoskop uygulaması ile yapıldı. Olgularımız % 90 nın da video-otoskop ile hastalığın kesin tanısı yapıldı. Sonuç olarak; köpeklerde dış kulak yolu hastalıklarının kesin tanısında uygulanan bu 3 görüntüleme yönteminden video-otoskopik yöntemin diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu belirlendi. Ultrasonografik yöntemin kendi başına yeterli olmayacağı, ancak kesin tanı için destekleyici bir yöntem olabileceği düşünüldü. Radyografik yöntemin ise tanı için yeterli olmadığı, yardımcı method olarak kullanılabildiği ancak spesifik olgularda uygulanabileceği saptandı. Video-otoskop uygulamasının, dış kulak yolu hastalıklarının tanısında kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir yöntem olduğu sonucuna ulaşıldı.

#### KAYNAKLAR

- Alkan Z.** Veteriner Radyoloji, Mina Ajans, Ankara, Türkiye. 1999; pp. 78-80.
- Choi H, Lee H, Chang D.** Ultrasonographic Evaluation of the External Ear Canal and Tympanic Membrane in Dogs. *Veterinary Radiology&Ultrasound.* 2006; 47: 94-98.
- Cole LK.** Oscopic evaluation of the ear canal. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 34(2): 397-410.
- Dickie AM, Doust R, Cromarty L, Johnson VS, Sullivan M, Boyd JS.** Ultrasound imaging of the canine tympanic bulla. *Res Vet Sci.* 2003; 75(2):121-126.
- Dursun N.** Veteriner Topografik Anatomi, Medisan, Ankara, Türkiye. 2001: pp. 56-59.
- Gotthelf LN.** Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2004; 34(2):469-487.
- Karabulut E, Han M.C.** Köpeklerde Dış Kulak Yolu ve Kulak Zarının Ultrasonografisi. *Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları.* 2007; 5(2): 138-140.
- Kealy JK, McAllister H.** Diagnostic Radiology Ultrasonography of the Dog and Cat. Elsevier, Missouri, USA. 2005; pp. 1-20.
- Keskin O, Kökçü L, Akan M.** Otitis Eksternal Köpeklerden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik



- Duyarlılıkları. Ankara Üniv Vet. Fak. Derg. 1999; 46:163-168.
- Kneissi S, Probsi A, Konar M.** Low-Field Magnetic Resonance Imaging of the Canine Middle and Inner Ear. *Veterinary Radiology & Ultrasound*. 2004; 45: 520-522.
- Maniscalco CL, Aquino JO, Passos RFB, Bürger CP, Moraes PC.** Videotoscopy use in the diagnosis of external otitis in dogs. *Ciencia Rural*. 2009; 39: 2455-2457.
- Öztürk S, Bilir B, Bumin A, Alkan Z.** Köpeklerde Pozitif Kontrast Kulak Kanalografisi. *Veteriner Cerrahi Dergisi*. 2000; 6: 36-39.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, Mcnamara JO, Williams SM.** *The Auditory System, Neuroscience, 2<sup>th</sup> Ed., Sinauer Associates Inc, Sunderland England*. 2001; pp. 223-243.
- Rosychuk RAW.** Management of otitis externa. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 1994; 24(5):921-52.
- Rosychuk RAW.** Veterinary Endoscopy for the Small Animal Practitioner, In: *Video-Otoscopy*, Ed; McCarthy TC, Elsevier, Missouri USA. 2005; pp.387-389.
- Samsar E, Akın F, Antepliöglu H.** Özel Şirurji. Medisan Yayınevi. Ankara, Türkiye. 2002; pp. 64-68.
- Samsar E, Akın F.** Dış Hastalıklarında Klinik Tanı Yöntemleri, Medipres, Malatya, Türkiye. 2000; pp:117-125.
- Studdert VP, Hughes KL.** A clinical trial of atypical preperation of miconazole, polymixin and prednisolone in the treatment of otitis externa in dogs. *Aust Vet J*. 1991; 68(6):193-195.
- Zur G.** Case report Bilateral ear canal neoplasia in three dogs. *Veterinary Dermatology*. 2005; 16:276-280.

## Koçlarda Bazı Androlojik Parametrelerin ve Biyokimyasal Özelliklerin Mevsimle İlişkisi<sup>#</sup>

Deniz YENİ\*, Mustafa GÜNDOĞAN

*Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Afyonkarahisar*

<sup>#</sup> Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 07.VF.06 nolu proje ile desteklenmiş ve aynı isimli doktora tezinden (2010-002) özetlenmiştir.

\*Corresponding author e-mail: dyeni@aku.edu.tr

### ÖZ

Bu çalışmada, Afyonkarahisar'da yetiştirilen 18-20 aylık yaşta 10 baş Pırlak koç kullanıldı. Koçların 1 yıl süre ile aylık olarak morfolojik testis ölçümleri, spermatolojik özellikler, spermatozoa DNA hasarı, bazı biyokimyasal parametreleri ve hormon düzeyleri ile birlikte iklimsel veriler değerlendirildi. Morfolojik testis ölçümleri ağustos ile ekim ayları arasındaki dönemde diğer aylara göre yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), ocak ile nisan ayları arasındaki dönemde en düşük değerler elde edildi. Sperma miktarları ile spermatozoa kitle hareketi, motilite ve yoğunluk değerleri ağustos ile ekim ayları arasındaki dönemde plazma membran bütünlüğü için ise yalnız kasım ayında en yüksek değerlerde bulundu ( $p<0.05$ ). Anormal ve ölü spermatozoa oranları eylül ve ekim aylarında diğer aylara göre düşük bulunmuştur ( $p<0.05$ ). Spermatozoa DNA hasarı yönünden en düşük değerler ekim ayında belirlendi. Kan serumu testosteron düzeyleri eylül ve ekim aylarında diğer aylara göre yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ) triiodotironin en düşük değerleri ağustos, kasım ve aralık aylarında tespit edildi ( $p<0.05$ ). Total protein, albumin, globulin miktarları kasım ayında yüksek bulunurken ( $p<0.05$ ), trigliserid miktarları kasım ayında en düşük düzeyde tespit edildi. Diğer yandan spermatozoa DNA hasarı ile sperma miktarı ( $r: 0.18$ ) ve anormal spermatozoa oranı ( $r: 0.30$ ) arasında pozitif yöndeki, sperma viskozitesi ( $r: -0.32$ ) ile negatif yöndeki ilişkiler önemli bulundu ( $p<0.01$ ). Sonuç olarak koçlarda morfolojik testis ölçümleri, spermatolojik özellikler, spermatozoa DNA hasarı, bazı kan serumu biyokimyasal parametreleri ve hormon düzeylerinin mevsimlerden önemli düzeyde etkilendiği görüldü ve optimum değerlerin elde edildiği aşım sezonunun Ağustos ayının ikinci yarısından itibaren başlayıp Kasım ayı ortalarına kadar devam ettiği ve morfolojik testis ölçümleri ile spermatolojik özellikler arasındaki korelasyon bulgularının damızlık seçiminde kullanılabileceği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** DNA hasarı, kan serumu, koç, mevsim, sperma

### Some Andrological Parameters and Biochemical Properties in Relation to Season in Rams

#### ABSTRACT

In this study averagely 18-20 months aged total ten head rams were used to evaluate the testicle morphometric measurements, semen characteristics, spermatozoon DNA damage, some blood biochemical properties and blood hormonal levels were monthly assessed together with climatic data. While the morphometric testes measurements of the rams were greater ( $p<0.05$ ) in the period between August and October than other months, the lowest values were obtained in the period between January and April. The highest values of volume, mass activity, motility and density levels, as to the spermatological features were found in the period between August and October and the highest values of the plasma membrane integrity just were found in November ( $p<0.05$ ). Nevertheless, abnormal and dead sperm ratios were found to be significantly lower ( $p<0.05$ ) in September and October than other months. The lowest DNA damage was determined on September in semen. Blood testosterone levels were found greater September and October than the other months. The lowest values of triiodothyronine levels were obtained in August, November and December ( $p<0.05$ ). While total protein, albumin and globulin levels were found to be significantly high ( $p<0.05$ ) in November, the lowest triglyceride level was obtained in November. Nevertheless, the positively correlation among sperm DNA damage, sperm volume ( $r: 0.18$ ) and abnormal sperm ratio ( $r: 0.30$ ), the negatively correlation between sperm DNA damage and semen viscosity ( $r: -0.32$ ) ( $p<0.01$ ) were found to be significant. In conclusion that the morphometric testes measurements, semen characteristics, spermatozoon DNA damage, certain blood sera biochemical properties and hormonal levels were affected by the season at a significant level and optimum values were obtained in breeding season which started from the second half of August until mid of the November and the correlation between findings of morphometric testes measurements and spermatological features can be used for selection of stud animals.

**Key words:** DNA damage, blood sera, ram, season, sperm

To cite this article: Yeni D. Gündoğan M. Koçlarda Bazı Androlojik Parametrelerin ve Biyokimyasal Özelliklerin Mevsimle İlişkisi. *Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 70-85.*

## GİRİŞ

Koyun yetiştiriciliği, tüm dünya ülkelerinde olduğu gibi Türkiye’de de hayvancılık sektörünün temel alanlarından biridir. Ülkemiz sosyo-ekonomik yapı ve ekonomik şartlar gereği başta Doğu, Güneydoğu ve İç Anadolu bölgelerinde koyun yetiştiriciliği yoğun olarak yapılırsa da diğer bölgelerde de önemli bir yere sahiptir.

Koyunlar mevsimsel poliöstrik hayvanlar olup koyunlarda reproduksiyonu etkileyen en önemli faktör mevsimdir. Mevsim ise temelde gün ışığı süresi ile ilişkilidir. Koyunlarda hem Güney hem de Kuzey yarımkürede günlerin kısaltmaya başladığı mevsimlerde üreme aktiviteleri başlar. Bu özellik laktasyondaki annenin ve yavrusunun yaşamını güvence altına almak amacıyla doğumun gün uzunluğunun ve yem temininin arttığı ilkbahar ve yaz mevsimi başında meydana gelmesini sağlamaktadır (Foster ve ark.1989).

Koçların gün ışığına olan hassasiyetleri koyunlardan farklıdır. Bazı ırk koçlarda seksüel aktivite yılboyu devam etmekle birlikte koyunlarda sıklıkla aktivite başladığında koçların seksüel aktivitesinin yüksek olmasını gerektirir. Büyük çaplı follikülerin varlığı nedeniyle anöstrüsteki koyunlar hormonal stimulyondan sonraki birkaç gün içerisinde ovulasyon gösterebilirken, koçlar spermatogenez süresinin tamamlanması için yaklaşık 45 güne ihtiyaç duyarlar (Rosa ve Bryant, 1989, Gündoğan ve ark. 2003).

Koçların genetik yapılarını taşıyan spermatozoonların üretim aşamasından kapasite olabilecek aşamaya kadar geçen süreç testislerde gerçekleşmektedir. Koçların testislerinde meydana gelen morfolojik veya fizyolojik üreme bozuklukları, bu koçların kullanıldığı sürünün döl verimlerini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Bundan dolayı aşım sezonunda veya öncesinde, sürülerin tohumlamasında kullanılacak koçlardan kaynaklanabilecek sorunların çözümü için koçların testis ve spermatolojik özelliklerinin önceden belirlenmesi önemlidir. Yapılan çalışmalarda (Gündoğan ve Demirci 2003, Türk ve Demirci 2005, Kaya ve ark. 1999) koçlarda sperma üretiminin yıl boyu devam ettiği, mevsimlere bağlı olarak spermatolojik özelliklerin değiştiği ve bu değerlerin yazın düşmeye başladığı sonbaharda ise arttığı bildirilmektedir.

Spermatolojik özelliklerin belirlenmesinde kullanılan klasik yöntemlere ilave olarak son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlayan sperma kalite testlerinden olan HOS (hipo-ozmotik şişme) testi, hücre içi ve dışı arasında ozmotik basınç dengeleninceye kadar fonksiyonel bütünlüğü bozulmamış aktif hücre membranından suyun geçişi esasına dayanmaktadır (Jeyendran ve ark. 1992). Bunun yanında spermatozoon DNA bütünlüğünün korunmuş olması başarılı bir gebelik

ve genetik materyalin sonraki kuşaklara taşınması açısından büyük önem taşır. Birçok çalışmada üremeye yardımcı tekniklerin kullanımının ardından tekrarlayan başarısızlıklarda erkek faktörünün önemine dikkat çekmektedir (Evenson ve ark 1999, Spano ve ark. 2000, Twigg ve ark. 1998, Agarwal ve ark. 2003, Sakkas ve ark. 2003). Spermatozoon DNA hasarının infertilitedeki önemi in vitro ve in vivo gerçekleştirilen çalışmalarda belirtilmekte olup hasarlı DNA taşıyan spermatozoonun fertilizasyon kabiliyetinin azaldığı ve DNA hasarlı spermatozoon oranı arttıkça doğal yolla gebe kalma oranının da azalabileceği bildirilmektedir. Bu yüzden ejakulatta DNA hasarlı spermatozoon oranının bilinmesi gerekse fertilizasyonun önceden tahmin edilmesinde gerekse embriyonun maruz kalabileceği durumların belirlenmesinde önem kazanmaktadır (Lopes ve ark. 1998, Ahmadi ve Ng 1999).

Suni tohumlama uygulamalarında spermanın değerlendirilmesinde spermatolojik karakterlerin dışında kan serumunun biyokimyasal özellikleri gibi parametreler de kullanılmakta ancak koç kan serumunun biyokimyasal muayenesi ve bunun spermatolojik özellikler ile ilişkisi tam anlamıyla bilinmemektedir. Daha önce farklı ırklardaki koçlar üzerinde sperma kalitesini, kan serum biyokimyasal ve enzimatik özelliklerin belirlenmesi amacıyla birçok araştırma yapıldığı, koyunlarda tiroid hormonlarının nöroendokrin üreme aktivitesinin gerçekleşmesinde önemli rol oynadığı belirlenmiştir (Gündoğan ve ark. 2004, Hafez 2009).

Diğer taraftan koçlarda reproduksiyonu etkileyen faktörlerin başında iklimsel verilerdeki değişimler, bakım ve beslenme şartları ve sosyal etkileşimler gibi faktörler gelmektedir (Gündoğan ve Tekerli 2004). Koçlarda dölverimini etkileyen faktörler birçok çalışmada değerlendirilmiş olmasına rağmen tüm faktörlerin ayrıntılı etkileri açıkça ortaya konamamıştır. Bu amaçla bu çalışmada Afyonkarahisar’da yetiştirilen 18-20 aylık 10 baş Pırlak koç üzerinde, 1 yıl süre ile aylık olarak morfometrik testis ölçümleri, spermatolojik özellikler, spermatozoa DNA hasarı, bazı biyokimyasal parametreler ve hormon düzeylerindeki değişimler ile birlikte aralarındaki ilişkiler değerlendirilmiştir.

## MATERYAL VE METOT

### Hayvan Materyali

Çalışma süresince hayvanlara yapılan tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu tarafından bildirilen kurallar doğrultusunda 15/01/2008 tarihli, (AKÜHEK 41-07) referans no’lu ve 123 sayılı etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Araştırmada hayvan materyali olarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi bünyesinde bulunan 18-20 aylık yaşta on baş Pırlak ırkı koç

kullanıldı. Koçlar yarı açık besi şartlarında yetiştirilen damızlık hayvanlar arasında Demirci (2002)'nin bildirdiği yöntemlerle androlojik muayeneleri yapılarak seçildi. Hayvanların her birinden ocak ile aralık ayları arasında ayda bir kez spermatolojik muayeneler, bir kez de spermatozoon DNA hasarının belirlenmesi amacı ile olmak üzere iki kez sperma alındı. Ayda bir kez morfometrik testis ölçüleri ve bir kez de kan serumunda biyokimyasal ve hormonal parametrelerin değerlendirilmesi için Vena Jugularis'den kan örnekleri alındı. Araştırma süresince morfometrik testis ölçümleri, spermatolojik muayeneler ve kan serum örnekleri aynı gün içinde erken saatlerde alındı ve örneklerin eş zamanlı alınmasına özen gösterildi. Koçların bakım ve beslenmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvancılık Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin bakım ve besleme koşullarından yararlandı. Hayvanların beslenmesi için hazırlanan rasyondan günlük olarak koç başına sabah 500 gr akşam 500 gr olmak üzere 1 kg konsantre yem karması ile sabah 750 gr akşam 750 gr kuru yonca verildi. Su ihtiyaçları için ise önlendirdeki suluklar sürekli dolu ve temiz tutuldu.

#### **Morfometrik Testis Ölçülerinin Alınması**

Testis ölçüleri alınmadan önce scrotum üzerinde bulunan yabancı maddeler ve yapağı bir makas yardımı ile kesilerek yıkanıp kurulandı. Testis uzunluğu, testis kalınlığı, scrotum çevresi, scrotum kalınlığı ve relatif testis hacmi değerleri usulüne uygun olarak belirlendi (Evans ve Maxwell 1987, Tekin 1994, Demirci 2002).

#### **Reaksiyon Süresi**

Koçların koyunların perineal bölgelerini koklamaya başlamalarından itibaren aşım girişiminde bulunmalarına kadar gösterdikleri davranışların gözlenip bu sürenin kaydedilmesi ile belirlendi (Tekin 1994).

#### **Spermanın Alınması ve Değerlendirilmesi**

Koçlardan sun'i vajen yardımı ile sperma alma esnasında fantom olarak kızgınlığı tespit edilmiş koyun, bulunmadığı dönemlerde ise kızgınlık göstermeyen koyunlar kullanıldı. Spermanın miktarı, viskozitesi ve pH'sı usulüne uygun olarak Tekin (1994)'in bildirdiği yöntemlere göre belirlendi. Spermatozoonların kitle hareketi ve spermatozoa motilitesi ısıtma tablalı faz kontrast mikroskopta (Olympus CX31, Olympus Optical Co., Ltd., Japan), spermatozoa yoğunluğu hemositometrik yöntemle, ölü-canlı spermatozoa oranı eosin-nigrosin boyama yöntemi ile anormal spermatozoa oranı sıvı fizyasyon yöntemi ile hipozmotik şişme testi (HOS Testi) 100 mOsm'lük HOST solüsyonu ile gerçekleştirildi (Jeyendran ve ark.1992, Tekin 1994).

#### **Spermatozoon DNA Hasarının Belirlenmesi**

Spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde Hughes ve ark.(1997)'nin bildirdiği şekilde Alkaline Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE) (Comet Assay) yöntemi kullanıldı. Değerlendirmede görsel skorlama (AU) tekniği kullanıldı (Collins 2004).

#### **Kan Örneklerinin Toplanması**

Koçlardan kan örnekleri ayda bir kez sabah saatlerinde Vena Jugularis'den steril iğne ve enjektör yardımı ile 8-10 ml alınıp 3000 RPM'de 15 dk. santrifüj edilerek elde edilen kan serumları ependorf tüplere aktarıldı. Örneklemeler tamamlanincaya kadar kan serumları -20°C'de depolandı (Mehmetoğlu 2002).

#### **Biyokimyasal Özellikler**

Biyokimyasal özelliklerden kan serum Total Protein, Albumin, Globulin, A/G oranları, Kolesterol ve Trigiserid miktarları ölçüldü. Tüm biyokimyasal değerlendirmeler Roche Diagnostics GmbH (D-68298, Mannheim, Germany)'den temin edilen kitler kullanılarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Hastanesi bünyesinde bulunan Roche Diagnostic cobas c-111 otoanalizatörde gerçekleştirildi. Total kan serum protein miktarları, biüret metodu ve TP Gen.2 monochromatic (Kat. No. 04657586 190 ) kit yardımı ile ölçüldü. Albumin miktarları, Albumin Gen.2 (Kat. No. 04657357 190) kit kullanılarak ölçüldü. Globulin miktarları kan serum total protein miktarından albumin miktarının çıkartılması sonucu elde edildi. A/G Oranı elde edilen kan serum albumin miktarlarının globulin miktarlarına bölünmesi suretiyle belirlendi. Trigliserid miktarları, enzimatik-kolorimetrik metot ile Triglycerides (Kat. No. 04657594 190) kit kullanılarak ölçüldü. Kolesterol miktarları ise Trigliserid miktarlarının belirlenmesinde kullanılan enzimatik-kolorimetrik metot ile Cholesterol Gen.2 (Kat. No. 04718917 190) kit yardımıyla ölçüldü. Enzim aktivitesi ile ilgili olarak Aspartate aminotransferase (AST) (Kat. No. 04657543 190) Alanine aminotransferase (ALT) IFCC (Kat. No. 04718569 190) kitleri yardımıyla ölçüldü. AST/ALT oranı belirlenen AST değerlerinin ALT değerlerine bölünmesi sonucunda elde edildi (Mehmetoğlu 2002, Doumas 1985).

#### **Kan Serum Hormon Tayini**

Kan serumu Total Testosteron ve triiodothyronine (T<sub>3</sub>) düzeylerinin belirlenmesi Düzen hormon laboratuvarında gerçekleştirildi. Testosteron ölçümleri Coated Tube RIA (Kapalı-Tüp Radioimmunoassay) metodu ile Active® Testosterone RIA DSL-400 (Diagnostic System Laboratories Inc. Webster, Texas, USA) kit ile 1470 Wizard Automatic Gamma Counter (Wallac, Turku, Finland) kullanılarak yapıldı. Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) miktarları

Electrochemiluminescence Immunoassay (ECLIA) yöntemi ile Roche Diagnostic Modular Analytics E170 Immunoassay System otoanalizator ve Roche Diagnostics GmbH (D-68298, Mannheim, Germany)'den temin edilen Roche Cobas T<sub>3</sub> (Triiodothyronine) kit kullanılarak belirlendi.

### İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmeleri için SYSTAT 5.0 istatistik programından yararlanıldı. Değişkenler arasında farkın önemliliğinin belirlenmesinde normal dağılmayan değişkenler için Wilcoxon ve Friedman testi ve normal dağılan değişkenler için student t-testinden

yararlanıldı. Elde edilen morfometrik testis ölçümleri, spermatolojik özellikler, kan serumu biyokimyasal ve hormonal özellikler arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde Pearson Korelasyon katsayıları kullanıldı. Önemlilik düzeyleri  $p < 0.05$  olarak değerlendirildi (Zar 1984).

### BULGULAR

#### İklimsel Veriler

Araştırma süresince Afyonkarahisar Meteoroloji Bölge Müdürlüğünden temin edilen Afyonkarahisar ili iklimsel verileri Tablo 1'de sunulmuştur.

**Tablo 1.** Araştırma süresince Afyonkarahisar ili meteorolojik verilerinin aylık ortalamaları.  
**Table 1.** The monthly mean meteorological data of Afyonkarahisar province during study.

	Sıcaklık (°C)	Basınç (hPa*)	Nispi Nem (%)	Güneşlenme Süresi (saat)	Gün Uzunluğu (saat)
<b>Ocak</b>	-1.80	902.30	71.10	4.90	9.49
<b>Şubat</b>	-0.40	903.40	65.60	6.20	10.46
<b>Mart</b>	9.20	894.10	56.40	6.40	11.59
<b>Nisan</b>	12.30	896.40	56.70	7.10	13.15
<b>Mayıs</b>	13.90	897.60	54.60	8.40	14.18
<b>Haziran</b>	21.40	897.50	41.90	10.20	14.50
<b>Temmuz</b>	23.50	895.70	36.10	11.40	14.33
<b>Ağustos</b>	24.80	895.90	37.60	11.50	13.37
<b>Eylül</b>	18.30	897.40	54.50	7.90	12.25
<b>Ekim</b>	12.00	902.60	67.00	7.00	11.10
<b>Kasım</b>	8.20	901.80	74.60	4.10	10.04
<b>Aralık</b>	2.00	902.00	57.70	3.60	9.30

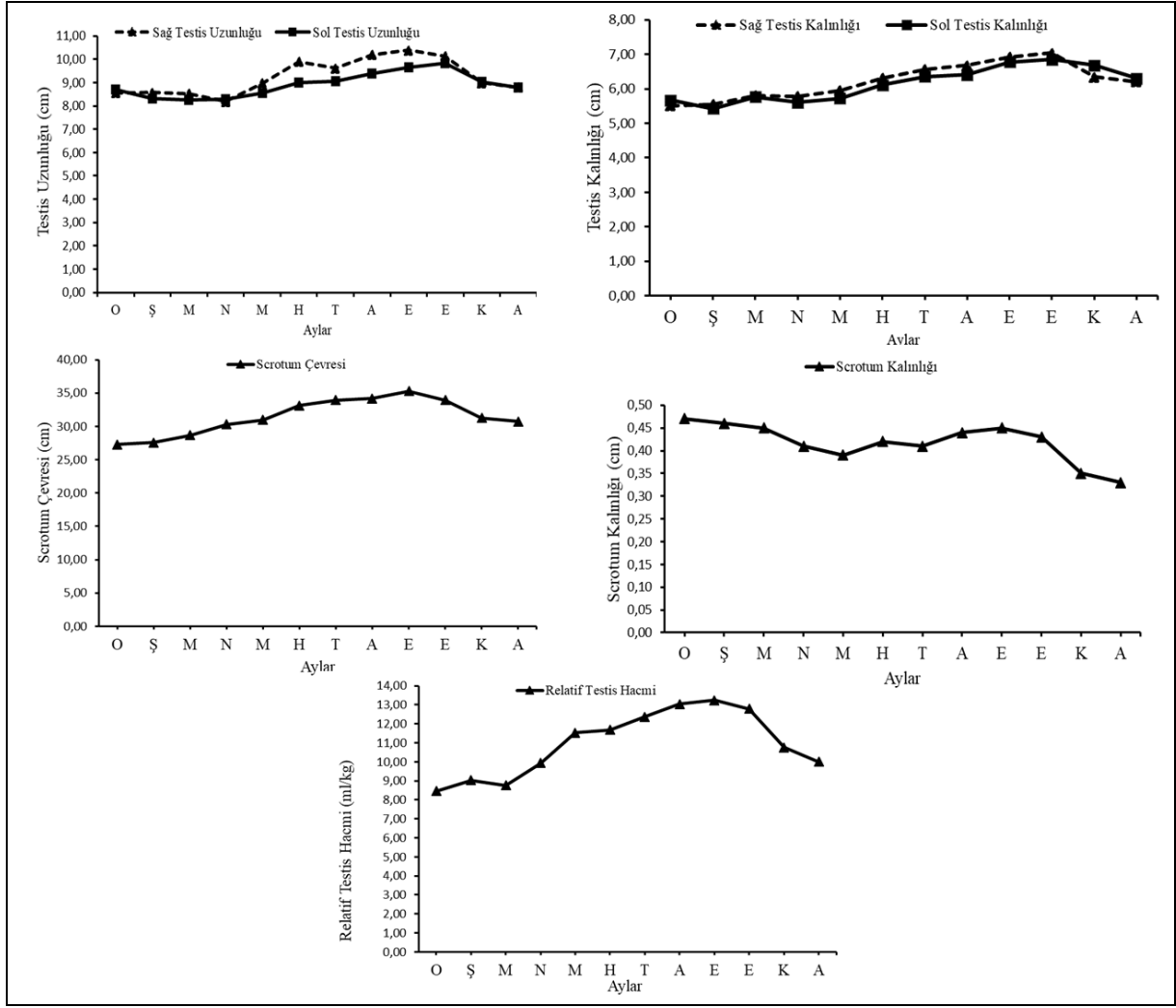
\* Hektopaskal

#### Morfometrik Testis Ölçümleri

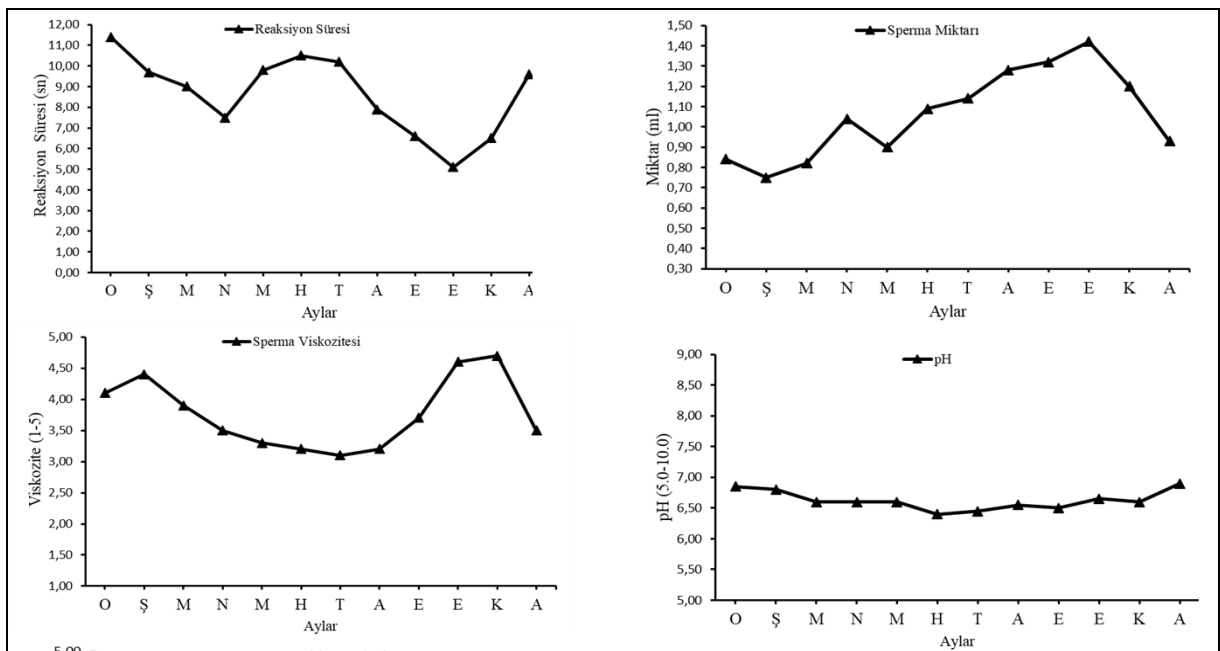
Koçların morfometrik testis ölçülerine ait aylık değişimleri Şekil 1'de verilmiş olup yapılan istatistiki değerlendirmede koçların morfometrik testis ölçümlerindeki aylık değişimler arasındaki farklar önemli bulunmuş ve en yüksek değerlerin elde edildiği aylar ölçüm kriterlerine bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak mayıs ile kasım ayları arasında olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ). Bunun yanında testis uzunlukları için mayıs ve haziran aylarındaki testis kalınlıkları için ise nisan, haziran, temmuz ve kasım aylarındaki sağ ve sol değerler arasındaki farklar istatistiki yönden önemli ( $p < 0.05$ ) bulunmuştur.

#### Spermatolojik Özellikler

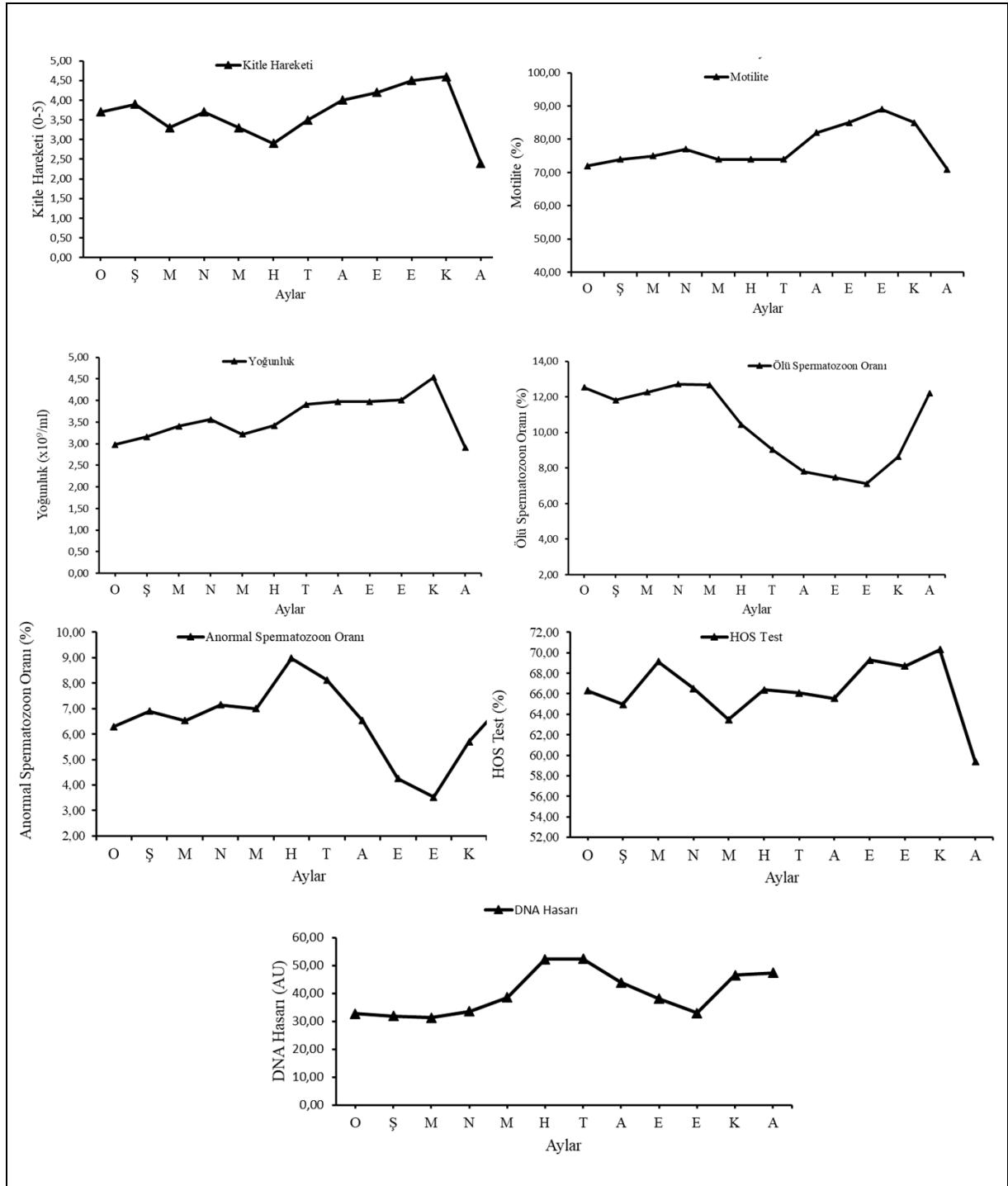
Çalışma süresince koçların reaksiyon süreleri, sperma miktarları, viskoziteleri ve pH'ları ile spermatozoon kitle hareketleri motiliteleri ve yoğunlukları, ölü ve anormal spermatozoon oranları HOS test ve DNA hasarına ilişkin aylık değişimler Şekil. 2 ve 3'te verilmiş olup aralarındaki farklar istatistiki olarak önemli bulunmuş ve ideal değerlerin Ağustos ve Kasım ayları arasındaki dönemde olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 1.** Koçların morfometrik testis ölçülerine ait aylık değişimler  
**Figure 1.** The monthly changes in morphometric testes measurements of rams



**Şekil 2.** Koçlarda spermanın makroskopik muayenelerinin aylık değişimleri  
**Figure 2.** Monthly alterations in macroscopic semen evaluation of rams



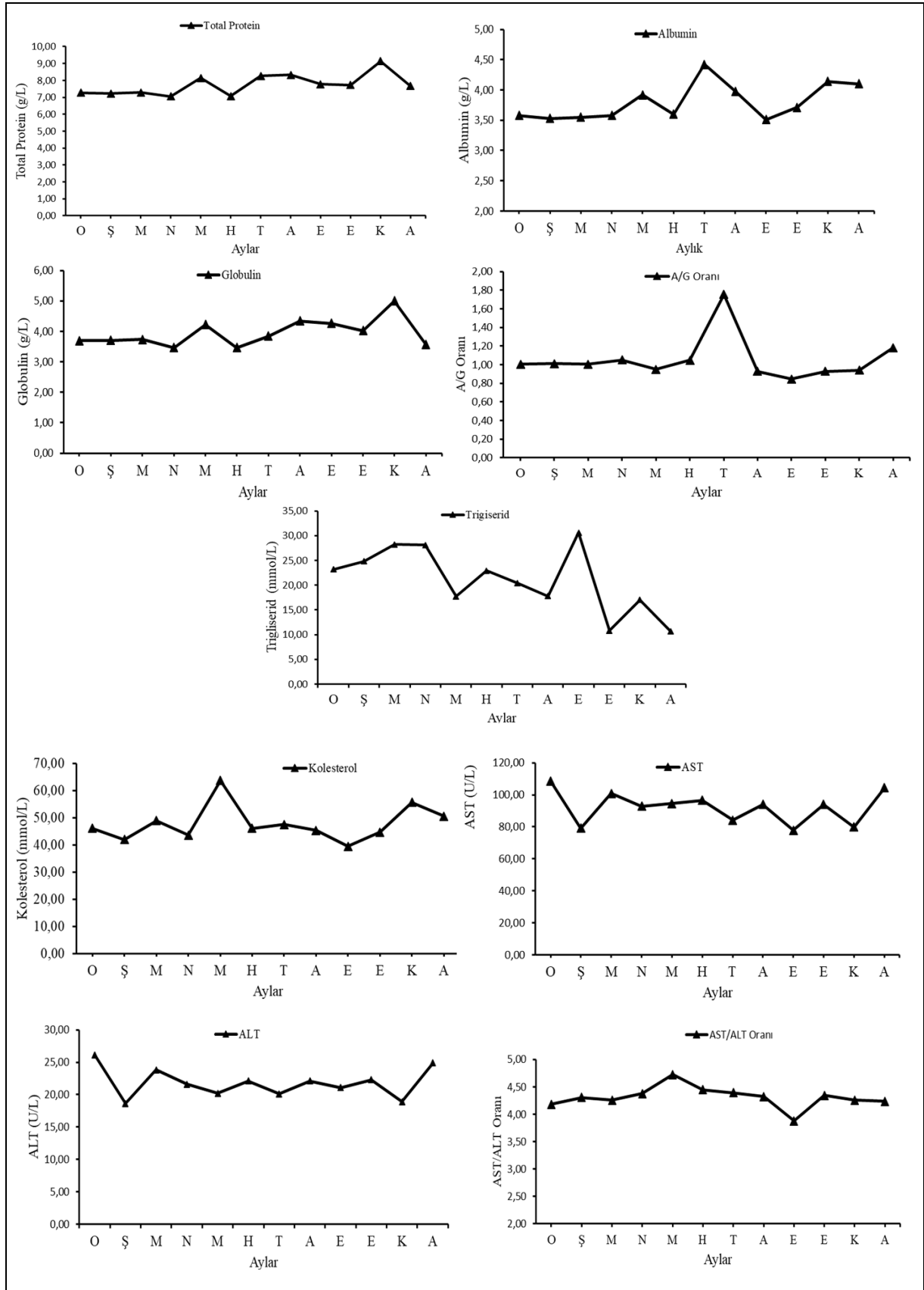
**Şekil 3.** Koçlarda spermanın mikroskopik muayenelerinin aylık değişimleri  
**Figure 3.** Monthly alterations in microscopic semen evaluation of rams

### **Biyokimyasal Özellikler**

Araştırma süresince koçların kan serumu total protein, albumin (A), globulin (G), A/G oranı, trigliserid, kolesterol, Aspartat Aminotransferaz (AST), Alanin Aminotransferaz (ALT) ve

AST/ALT oranlarına ait aylık değişimler Şekil 4'te verilmiş olup yapılan istatistiki değerlendirmede koçların kan serumu biyokimyasal özelliklerindeki aylık değişimler arasındaki farkın önemli olduğu gözlenmiştir ( $p < 0.05$ ).



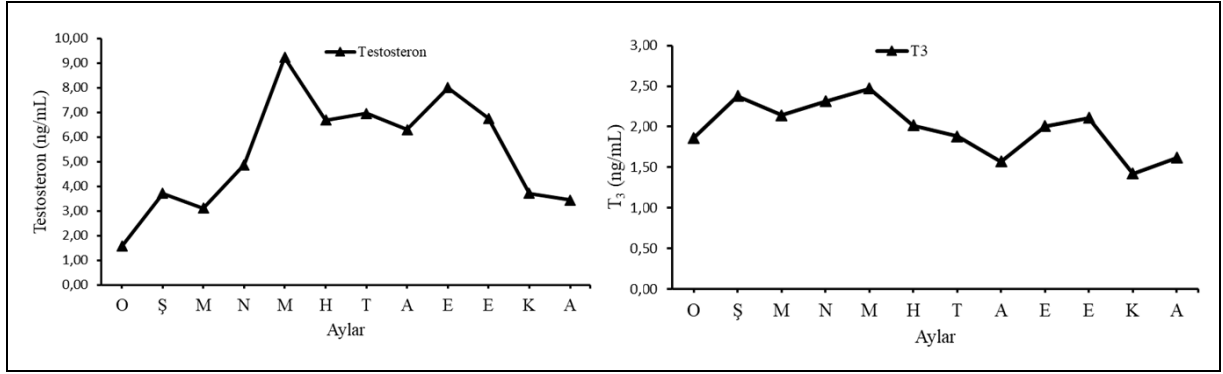


Şekil 4. Koçların kan serumu biyokimyasal özelliklerine ait aylık değişimler  
 Figure 4. Monthly fluctuation in blood sera certain biochemical features of rams

### Hormonal Özellikler

Araştırma süresince koçların kan serumu testosteron ve triiodothyronine (T<sub>3</sub>) miktarlarına ait

aylık değişimler Şekil 5'te verilmiş olup hormonal özelliklerdeki aylık değişimler arasındaki farklar istatistiki yönden önemli bulunmuştur (p<0.05).



Şekil 5. Koçların kan serumu testosteron ve triiodothyronine (T<sub>3</sub>) miktarlarına ait aylık değişimler  
Figure 5. Monthly changes in blood sera testosterone and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) levels of rams

### Korelasyon Bulguları

Araştırma süresince koçların kan serumu biyokimyasal özellikleri ve hormon miktarları ile spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları tablo 2'de verilmiştir. Buna göre özellikle kitle hareketi (r: 0.33), motilite (r: 0.41) ve yoğunluk (r: 0.37) ile HOS testi değerleri arasında pozitif (p<0.01) yöndeki, reaksiyon süreleri (r: -0.31) ve ölü spermatozoon oranları (r: -0.29) arasında negatif yöndeki korelasyonlar önemli (p<0.05) bulunmuştur. Bunun yanında spermatozoon DNA hasarı ile sperma miktarı (r: 0.18) ve anormal spermatozoon oranı (r: 0.30) arasında pozitif (p<0.05), sperma viskozitesi (r: -0.32) ile ise negatif (p<0.01) yönde gözlenen ilişkiler önemli bulunmuştur. Ölü spermatozoon oranları ile scrotum çevreleri (r: -0.49) ve relatif testis hacimleri (r: -0.38), testis uzunlukları (r: -0.36 ve -0.34) ve kalınlıkları (r: -0.44 ve -0.42) arasında yüksek düzeyde önemli (p< 0.01) korelasyonlar elde edilmiştir. Ayrıca morfometrik testis ölçüleri ile HOS testi değerleri arasındaki ilişkilerde önemli (p<0.05) bulunmuştur. Koçların scrotum çevreleri ile kan serumu total protein (r: 0.18) ve albumin (r: 0.18) miktarları arasında pozitif yöndeki (p<0.05) korelasyonların ve yine koçların relatif testis hacimleri ile kan serumu AST aktiviteleri (r: -

0.33) arasında negatif yöndeki yüksek düzeyde önemli (p<0.01) korelasyonların varlıkları dikkat çekicidir. Ayrıca koçların kan serumu testosteron miktarları ile scrotum çevreleri (r: 0.35), relatif testis hacimleri (r: 0.36), testis uzunlukları (r: 0.29), testis kalınlıkları (r: 0.28 ve 0.23) arasında pozitif yönde korelasyonlar da önemli (p<0.05) bulunmuştur. Özellikle koçların kan serumu total protein miktarları ile sperma miktarı (r: 0.18) ve spermatozoon motilitesi (r: 0.28) yoğunluğu (r: 0.27) ve HOS testi değerleri (r: 0.22) arasında pozitif yöndeki korelasyonlar önemli (p<0.05) bulunmuştur. Ayrıca koçların kan serumu AST aktiviteleri ile spermatozoonların kitle hareketleri (r: -0.25), motiliteleri (r: -0.29), yoğunlukları (r: -0.19) ve HOS testi değerleri (r: -0.18) arasında negatif (p<0.05) ölü spermatozoon oranları (r: 0.34) arasında ise pozitif (p<0.01) yönde korelasyonlar gözlenmiştir. Bununla birlikte kan serumu testosteron miktarları ile spermatozoon motilitesi (r: 0.18) ve kitle hareketleri (r: 0.18) arasında pozitif yönde, ölü spermatozoon oranı (r: -0.19) arasında ise negatif yönde önemli (p<0.05) korelasyonlar bulunmuştur. Koçlardaki spermatozoon DNA hasarları ile kan serumu T<sub>3</sub> (r: -0.30) seviyeleri arasında da negatif yöndeki korelasyonlar önemlilik (p<0.05) arz etmektedir.

**Tablo 2.** Araştırma süresince koçların kan serumu biyokimyasal özellikleri ve hormon miktarları ile spermatolojik özellikleri arasındaki korelasyon bulguları

**Table 2.** Correlations between blood sera certain biochemical features, hormone levels and spermatological characteristics of rams during the study

	Reaksiyon süresi	Miktar	Viskozite	pH	Kitle hareketi	Motilite	Yoğunluk	Anormal spermatozoon	Ölü spermatozoon	HOS test	DNA hasarı
Total Protein	*	*				*	*		*	*	
Albumin (A)				*			**				
Globulin (G)		*			*	*		*	*		
A/G							*	*			
Trigliserid											
Kolesterol											
AST					*	*	*		**	*	
ALT					*		*				
AST/ALT						**		*	*		
Testosteron					*	*			*		
T <sub>3</sub>							*				*

\*p < 0.05

\*\*p < 0.01

## TARTIŞMA

Kalıtım derecesinin yüksek olmasından dolayı testisin morfolojik özelliklerinin belirlenmesi dölverimine yönelik ıslah çalışmalarına hız kazandırabilecek önemli bir faktördür (Hafez 1987, Falla-Rad ve ark. 2001). Bu çalışmadan elde edilen morfolojik testis ölçümleri ile ilgili istenilen verilerin genellikle eylül-ekim aylarında görüldüğü belirlenmiş olup ocak-şubat aylarında bu değerlerin istenen değerlerden uzaklaştığı tespit edilmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen morfolojik testis ölçümleri ile ilgili bulguların literatür bilgileriyle paralellik arz etmesi bu çalışmanın benzer çalışmalarla uyum içerisinde olduğunun göstergesidir (Gündoğan ve ark. 2003, Taha ve ark. 2000, Aksoy ve ark. 1994). Bunun yanında elde edilen bulguların bazılarının literatür bulgularından farklılık göstermesi ise kullanılan koçların ırkı ve vücut kondisyonları başta olmak üzere genetik yapı, yaş, bakım ve beslenme, ölçümleri yapan kişi, kullanılan değerlendirme tekniği, coğrafi konum ve iklim özellikleri gibi faktörlerin etkisine bağlı olabilir (Ataman ve ark. 1996, Zamiri ve Khoaeidei 2005).

Erkek hayvanlarda spermatolojik özelliklerin belirlenmesi hem koçların fertilitesi hem de küçük ruminantlar için sürü fertilitesi açısından önemli bir yer tutmaktadır. Bu çalışmada materyal olarak kullanılan koçların spermatolojik özelliklerine ait dağılımlar Şekil 2 ve 3'te verilmiştir. Buna göre spermatolojik özelliklerle ilgili tüm değerlerin aylık

değiştigi gözlenmiş olup spermatolojik değerlerden spermatozoon membran bütünlüğü yıl boyunca ortalama % 66.34 ± 0.81 olarak bulunurken aylık değişimler arasındaki farklar istatistiki yönden önemli bulundu. Plazma membran bütünlüğü ile ilgili bulunan değerler Aisen ve ark.(2002)'nin aşım mevsiminde Pampinta koçlarda yaptıkları çalışmada bildirdikleri değerlerden ve Bucak ve Tekin (2007)'in Sakız koçlarda aşım mevsiminde +5 °C'de saklanan spermada bildirdikleri değerlerden düşük bulunurken, Ollero ve ark. (1997)'nin Salz koçlarda bildirdikleri değerlerle, Gündoğan (2009)'in Pırlak koçlarda aşım mevsiminde bildirdikleri değerlerle ve Bucak ve ark. (2007)'nin Akkaraman koçlarda Aşım mevsiminde +5 °C'de saklanan spermada bildirdikleri değerlere yakın bulundu.

Günümüzde erkeklerin fertilitelerinin tahmin edilmesinde ve fertilitenin sürdürülebilirliğinde spermatolojik özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra spermatozoon DNA hasarının tespit edilmesi önemli bir yere sahiptir. Chan ve ark. (2001) düşük DNA hasarı ile spermatozoonun hiperaktivasyonu ve oosit penetrasyonu arasında ilişki olduğunu bildirmektedirler. Kasimanickam ve ark. (2006) Polled Dorset, Hampshire ve Suffolk ırkı 6-11 aylık erkek kuzularda DNA hasarını SCSA yöntemi ile belirlemişler ve klasik sperma parametreleri ile DNA hasarı arasında negatif bir korelasyon bulunduğunu bildirmektedirler. Garcia-Macias ve ark. (2006) Churra koçlarda yine SCSA yöntemi ile belirledikleri spermatozoon DNA hasarındaki mevsimsel farkın önemli olduğunu

belirtmektedirler ( $p < 0.05$ ). Spermatozoon DNA hasar düzeyleri yıl boyunca ortalama  $30.15 \pm 1.17$  AU olarak bulunmuş ve aylık değişimler gözlenmiş olup en yüksek değer Temmuz ayında  $42.40 \pm 2.88$  AU olarak ve en düşük değer ise Mart ayında  $21.30 \pm 3.05$  AU olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte koçlarda yıl boyunca aylar arasında spermatozoon DNA hasar düzeyleri yönünden gözlenen farkın istatistiksel öneme sahip olduğu gözlenmiş olup anormal spermatozoon oranı ile pozitif yönde ilişkiler önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Bu bulgular spermatozoon DNA hasarında mevsimsel değişimlerin görüldüğü ve çevre sıcaklığının etkin bir rol oynadığı ve ayrıca anormal spermatozoon oranı ile ilişkili olduğu yönündeki bulgular ile uyum içerisindedir (Ding ve ark. 2004, Fraser ve Strzezek 2004, Gliozzi ve ark. 2006, Lopez-Fernandez ve ark. 2008).

Bu çalışmada elde edilen spermatolojik değerler ile literatür değerleri arasında paralellik gözlenmesinin yanı sıra kimi literatür bilgileri arasındaki farklılıkların sebepleri arasında ırk, yaş, bakım yöntemi, beslenme koşulları, araştırmanın yapıldığı bölgenin coğrafi konumu, iklim koşulları, değerlendirmeyi yapan kişi kullanılan metot, teçhizat ve kimyasal maddeler sayılabilir.

Koçların kan serumlarında total protein miktarları ile ilgili bulduğumuz değerler, Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman koçlarda ve Gündoğan ve ark. (2004)'nin Sakız ve Dağlıç koçlarda aşım mevsiminde bildirdikleri değerlerden yüksek, Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsiminde ve Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazmasında bildirdikleri değerlerden düşük olduğu gözlenmiştir. Albumin değerleri ise Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsimlerinde bildirdikleri değerden düşük, Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman ve İvesi koçlarda ve Gündoğan ve ark. (2004)'nin aşım mevsiminde Sakız ve Dağlıç koçlarda bildirdikleri değerlerden yüksek, Zamiri ve Rezaei-Roodbari (2004)'nin Gazel ve Mehreban koçlarda ve Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda bildirdikleri değerden ise düşük bulundu. Globulin miktarları da Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman koçlarda bildirdikleri değere yakın, İvesi koçlarda bildirdikleri değerden ise düşük, Gündoğan ve ark. (2004)'nin aşım mevsiminde Sakız ve Dağlıç koçlarda ve Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsimlerinde bildirdikleri değerlerden yüksek, Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazmasında bildirdiği değerden düşük bulundu. Bu çalışmada ortalama  $1.05 \pm 0.07$  olarak bulunan Albumin/Globulin oranı Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman koçlarda bildirdikleri değere yakın, İvesi koçlarda bildirdikleri değerden yüksek ve Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazmasında

bildirdiği değerden de düşük olmuştur. Kan serumu trigliserid miktarları ortalama  $21.02 \pm 0.82$  mg/dL olarak bulunan bu çalışmada yüksek değer  $30.60 \pm 4.06$  mg/dL ile Eylül ayında, en düşük değer ise  $10.70 \pm 0.62$  mg/dL ile Aralık ayında tespit edildi. Bulunan bu değerler, Gabryszuk ve ark. (2007) erkek Merinos kuzularda, Zamiri ve Rezaei-Roodbari (2004)'nin Gazel ve Mehreban koçlarda ve Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazma trigliserid düzeylerini bildirdikleri değerlerden düşük ve Lough ve ark. (1991) Hampshire ve Suffolk kuzularda ve Yur ve ark. (1998) ile Gündüz ve Mert (1997)'in koyunlarda bildirdikleri değerler ile paralellik arz etmektedir. Yıl boyunca ortalama kan serumu kolesterol miktarları  $47.81 \pm 0.97$  mg/dL olarak bulunan bu çalışmada en yüksek değer  $63.70 \pm 3.58$  mg/dL olarak Mayıs ayında ve en düşük değer de  $39.50 \pm 2.49$  mg/dL olarak Eylül ayında elde edildi. Kolesterol düzeyleri ile ilgili bulunan değerler, Nisbet ve ark. (2006)'nın Karayaka koçlarda bildirdikleri değere yakın, Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman ve İvesi koçlarda, Gündoğan ve ark. (2004)'nin Sakız ve Dağlıç koçlarda aşım mevsiminde bildirdikleri değerlerden yüksek, Raghuvansi ve ark. (2007)'nin Malpura koçlarda ve Zamiri ve Khodaei (2005)'nin Ghezel and Mehraban koçlarda bildirdikleri değerlerden ise düşük olmuştur. Bu çalışmada elde edilen AST aktivitesi, Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsimlerinde bildirdikleri değerlere yakın, Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman ve İvesi koçlarda, Gündoğan ve ark. (2004)'nin aşım mevsiminde Sakız ve Dağlıç koçlarda bildirdikleri değerlerden düşük, Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazmasında bildirdiği değerden ise yüksek bulundu. ALT aktivitesi ile ilgili değerler, Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsimlerinde bildirdikleri değerlere yakın, Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman ve İvesi koçlarda bildirdikleri değerlerden yüksek, Gündoğan ve ark. (2004)'nin aşım mevsiminde Sakız koçlarda bildirdikleri değere yakın ve Dağlıç koçlarda bildirdikleri değerden yüksek, Hafez (2009)'in Rahmani koçların kan plazmasında bildirdiği değerden ise düşük bulundu. Bulunan AST/ALT oranı Gündoğan ve Serteser (2005)'in aşım mevsiminde Akkaraman ve İvesi koçlarda bildirdikleri değerlerden düşük ve Hafez (2009)'in Rahmani koçlarda kan plazmasında bildirdiği değerden ise yüksek bulundu.

Bu çalışmada kan serumu Testosteron miktarları yıl boyunca ortalama  $5.24 \pm 0.42$  ng/ml olarak bulundu. Bulunan bu değer farklı ırklara ait koçlarda bildirilen değerlerin bazıları (Gündoğan ve ark. 2003, Duofour ve ark. 1984) ile paralellik arz ederken bazılarından (Taha ve ark. 2000, Marai ve ark. 2009) düşük ve kimilerinden (Gündoğan ve

Serteser 2005, Gündoğan ve Demirci 2003, Türk ve Demirci 2005) de yüksek bulunmuştur. Elde edilen koçların kan serumundaki T<sub>3</sub> miktarları ile ilgili değerler, Tajangookkeh ve ark. (2007)'nin Shall, Afshari ve Zandi koçlarda yıl boyu, Souza ve ark. (2002)'nin Polwarth–İdeal koçlarda yıllık ortalama, Taha ve ark. (2000)'nin ithal ve yerli İvesi ve Barki koçlarda yıllık ortalama sırasıyla, Marai ve ark. (2009)'nin Suffolk koçlarda kış ve yaz mevsimlerinde, Zamiri ve Khodaei (2005)'nin Ghezal and Mehraban koçlarda ve Karahan ve ark. (2002)'nin Akkaraman koçlarda bildirdikleri değerlerden yüksek, Gündoğan (2007)'in Sakız ve Dağlıç koçlarda yıl boyu bildirdikleri değerlerden de düşük olmuştur. Çalışma sonucunda bulunan kan serumu biyokimyasal ve hormonal değerlerin literatür değerlerinden yüksek veya düşük olmasının nedenleri arasında materyal olarak kullanılan koçların ırkı, yaşı, bakım ve özellikle yüksek enerjili beslenme, yaşadıkları bölgenin iklim şartları, kan alma zamanı ve yeri değerlendirmede kullanılan metot, serum veya plazmada tayin edilmesi gibi faktörler sayılabilir.

Korelasyon bulguları dikkate alındığında yıl buyu scrotum kalınlıkları dışında morfometrik testis ölçümlerinin kendi aralarında korelasyonlar gözlenmiştir. Scrotum çevresi ile testis kalınlıkları ve testis hacmi arasında bulduğumuz pozitif korelasyon Aksoy ve ark. (1994)'nin Merinos koçlarda yaptıkları çalışma ile uyumludur. Ataman ve ark. (1996)'nin Merinos toklularda aşım mevsimi içi ve dışında testis uzunlukları ve testis kalınlıkları ile scrotum çevresi, testis kalınlıkları ve uzunlukları arasında buldukları pozitif korelasyonlar ( $p<0.05$ ) bu çalışmada ki bulgular ( $p<0.01$ ) ile paraleldir. Gündoğan ve ark. (2003)'nin Dağlıç, Sakız, Akkaraman ve İvesi koçlarda aşım sezonu öncesi sağ testis uzunluğu ile sol testis uzunluğu arasında ( $p<0.05$ ), sağ testis kalınlığı ile sol testis kalınlığı arasında ( $p<0.01$ ) ve scrotum hacmi ile scrotum çevresi arasında ( $p<0.01$ ), aşım sezonu esnasında sağ ve sol testis uzunlukları arasında ( $p<0.01$ ), sağ ve sol testis kalınlıkları arasında ( $p<0.01$ ), sağ testis kalınlığı ile sol testis uzunluğu arasında ( $p<0.05$ ), scrotum hacmi ile scrotum çevresi arasında ( $p<0.01$ ) ve aşım sezonu sonrasında sağ testis uzunluğu ile sol testis uzunluğu arasında ( $p<0.05$ ), sağ testis kalınlığı ile sol testis kalınlığı arasında ( $p<0.05$ ) ve scrotum hacmi ile scrotum çevresi arasında ( $p<0.01$ ) bildirdikleri pozitif korelasyonlar bu çalışmanın bulguları ile uyum içindedir. Mert ve ark. (2009)'nin Norduz, Karakaş ve Ile de France x Akkaraman melezi koçlarda testis kalınlığı ile scrotum çevresi arasında buldukları pozitif korelasyon yaptığımız çalışmada da önemli bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Koyuncu ve ark. (2000)'nin Karayaka koçlarda testis kalınlığı ile testis uzunluğu arasında ( $p<0.01$ ) ve scrotum çevresi ile testis kalınlığı ve uzunluğu arasında buldukları pozitif

korelasyonlar ( $p<0.01$ ) bu çalışmada da tespit edilmiştir. Koyuncu ve ark. (2005)'nin Kıvrırcık kuzularda testis kalınlığı, testis uzunluğu ve scrotum çevresi aralarında buldukları pozitif korelasyonlar ( $p<0.01$ ) yine bu çalışmada da gözlenmiştir. Gündoğan ve Serteser (2005)'in Akkaraman ve İvesi koçlarda relatif testis hacmi ile motilite ( $p<0.05$ ) ve yoğunluk ( $p<0.01$ ) arasında bildirdikleri negatif korelasyon bu çalışmada ( $p<0.01$ ) pozitif olarak bulunmuştur.

Kışık (2008)'in Rahmani koçlarda reaksiyon süresi ile motilite ( $p<0.01$ ) ve yoğunluk ( $p<0.01$ ) arasında bildirdiği negatif korelasyon ve motilite ile sperma miktarı ( $p<0.05$ ) ve yoğunluk ( $p<0.01$ ) arasındaki pozitif korelasyon, Karagiannidis ve ark. (2000) Sakız ve Fresian koçlarda motilite ve anormal spermatozoon oranı arasında bildirdikleri negatif korelasyon, Kaya ve ark. (1999)'nin Merinos koçlarda sperma miktarı ile yoğunluk ve motilite arasında bildirdikleri pozitif korelasyon ile ölü spermatozoon oranı ve anormal spermatozoon oranı arasında bildirdikleri negatif korelasyon, yoğunluk ile motilites ve ölü spermatozoon oranı arasında bildirdikleri negatif korelasyon ve motilite ile ölü spermatozoon oranı ve anormal spermatozoon oranı arasında bildirdikleri negatif korelasyon, Mert ve ark. (2009)'nin Norduz, Karakaş ve Ile de France x Akkaraman melezi koçlarda viskozite ile kitle hareketi ve motilite arasında bildirdikleri pozitif korelasyon, motilite ile kitle hareketi arasında pozitif korelasyon ve sperma miktarı ile yoğunluk arasında bildirdikleri pozitif korelasyon, Gündoğan ve Serteser (2005)'in Akkaraman ve İvesi koçlarda anormal spermatozoon oranı ile motilite arasında bildirdikleri negatif korelasyon, Salhab ve ark. (2003)'nin İvesi koçlarda miktar, motilite ve yoğunluk arasında bildirdikleri pozitif korelasyon, Yılmaz ve Cengiz (2006)'in Norduz koçlarda sperma miktarı ile motilite, kitle hareketi ve yoğunluk arasında pozitif anormal spermatozoon arasında ise negatif korelasyon, viskozite ile kitle hareketi, motilite ve yoğunluk arasında pozitif anormal spermatozoon arasında ise negatif korelasyon, kitle hareketi ile motilite ve yoğunluk arasında ise pozitif anormal spermatozoon arasında ise negatif korelasyon, motilite ile yoğunluk arasında pozitif anormal spermatozoon arasında bildirdikleri negatif korelasyon, Ataman ve ark. (1996) Merinos koçlarda sperma miktarı ile kitle hareketi, motilite ve yoğunluk arasındaki, motilite ile yoğunluk ve kitle hareketi arasındaki, yoğunluk ile kitle hareketi arasındaki pozitif korelasyon ve anormal spermatozoon oranı ile miktar, yoğunluk ve kitle hareketi arasındaki negatif korelasyon bu araştırmada da gözlenmiştir.

Gündoğan (2009) Pırlak koçlarda farklı sulandırıcılarla kısa süreli saklanan spermada membran bütünlüğü ile motilite arasında pozitif,

anormal ve ölü spermatozoon oranları arasında negatif korelasyon bu çalışmada da elde edilmiş ancak anormal spermatozoon oranı ile aralarında bulunan negatif korelasyon önemsiz bulunmuştur. Fukui ve ark. (2004)'nın South Down ve Merinos x Dorset koçlarda plazma membran bütünlüğü ile motilite arasında buldukları pozitif korelasyon bu çalışmada da önemli bulunmuştur. Bunun yanında, Kasimanickam ve ark. (2006) 6-11 aylık Dorset, Hampshire ve Suffolk koçlarda SCSA yöntemi ile belirledikleri DNA hasarı ile primer spermatozoon defekti arasında bildirdikleri pozitif ( $p<0.01$ ) korelasyon bu çalışma ile örtüşmektedir. Moskovtsev ve ark. (2005) insanlarda spermatozoon DNA hasarını flow cytometre ile belirledikleri çalışmada DNA hasarı ile normal morfolojiye sahip spermatozoonlar arasında negatif korelasyon bulguları bu çalışma ile paralellik arz ederken DNA hasarı ile yoğunluk ve motilite arasında elde edilen negatif korelasyon bu çalışmada önemli bulunamamıştır. Smith ve ark. (2006) varikoselli hastalarda SCSA yöntemi ile belirledikleri DNA hasarı ile normal morfoloji arasında bildirdikleri negatif korelasyon bu çalışmada bulguları arasındadır. Bu da infertil erkeklerde anormal spermatozoon morfolojisinin yüksek DNA hasarına neden olduğuna dikkat çeken birçok araştırmacı (Cebesoy ve ark. 2006, Song ve ark. 2006, Huang ve ark. 2005)'yı destekler niteliktedir.

Araştırmada kullanılan koçların morfometrik testis ölçümleri ile spermatolojik özellikler arasındaki korelasyona bakıldığında Aksoy ve ark. (1994)'nın Merinos koçlardaki çalışmada testis uzunluğu ve yoğunluk arasındaki pozitif korelasyon çalışmamızda da bulunmuştur ( $p<0.01$ ). Gündoğan ve ark. (2003)'nın Dağlıç, İvesi, Sakız ve Akkaraman koçlarda aşım sezonu esnasında koçların testis kalınlıkları ile sperma miktarı arasında buldukları pozitif ve scrotum kalınlığı ile reaksiyon süresi arasındaki negatif korelasyon bu çalışma ile uyum içerisindedir. Elmaz ve ark. (2007) Kıvırcık kuzuların 7-8 aylık dönemdeki motilite, sperma miktarı ve yoğunluk ile scrotum çevresi, testis kalınlığı ve testis uzunluğu arasında bildirdiği pozitif korelasyon bu çalışmada da görülmektedir. Gündoğan ve ark. (2003)'nın Dağlıç, İvesi, Sakız ve Akkaraman koçlarda aşım sezonu öncesinde koçların scrotum çevresi ile reaksiyon süresi arasında bildirdikleri pozitif korelasyon bu çalışmada negatif yönde gözlenmiştir. Ataman ve ark. (1996)'nın aşım mevsimi dışında Merinos koçlarda ölü spermatozoon oranı ile scrotum çevresi, testis uzunluğu ve testis kalınlığı arasında bildirdiği korelasyonlar bu çalışmada da tespit edilmiştir. Gündoğan (1999) Akkaraman koçlarda scrotum çevresi ile sperma pH'sı ve viskozitesi arasında korelasyonlar pozitif yönde bildirilmiş ancak bu çalışmada negatif yönde bulunmuştur

( $p<0.05$ ). Gündoğan ve Elitok (2004)'nın Sakız ve Dağlıç koçlarda total protein ile motilite ve yoğunluk arasında, globulin ile motilite, AST/ALT oranları ile anormal spermatozoon oranı arasında bildirdikleri pozitif korelasyon ile AST ile yoğunluk arasında bildirdikleri negatif korelasyon bu çalışma ile uyumlu iken A/G oranı ile anormal spermatozoon oranı arasında bildirdikleri negatif korelasyon bu çalışmada pozitif olarak bulundu. Türk ve Demirci (2005)'nin Akkaraman koçlarda testosteron düzeyleri ile sperma miktarı ve motilite arasında bildirdikleri pozitif korelasyon, Gündoğan (2006) Akkaraman ve İvesi koçlarda seminal plazma AST miktarı ile yoğunluk arasında bildirdiği negatif korelasyon ve Kishk (2008)'in Rahmani koçlarda testosteron miktarı ile motilite arasında bulunduğu pozitif korelasyonlar bu çalışma ile uyumludur. Gündoğan ve Serteser (2005)'in Akkaraman ve İvesi koçlarda kan serum total protein miktarları ile albumin ve globulin miktarları arasında bildirdikleri pozitif korelasyon ile AST miktarları arasında bildirdikleri negatif korelasyon bu çalışma ile uyumlu iken total protein ile ALT miktarları arasında bildirdikleri pozitif ve kolesterol miktarları arasında bildirdikleri negatif korelasyon ile farklı korelasyonlar bulundu.

## SONUÇ

Pırlak ırkı koçlarda morfometrik testis ölçümleri, spermatolojik özellikler ve kan serumu biyokimyasal ve hormonal özelliklerinin araştırıldığı bu çalışmada elde edilen bulguların diğer yerli ırklarımıza yakın değerlerde olduğu ve bu özelliklerin mevsimlerden önemli derecede etkilendiği, optimum değerlerin elde edildiği aşım sezonunun ağustos ayının yarısında başlayıp kasım ayı ortalarına kadar sürdüğü ve dolayısıyla bu dönem içerisinde kullanılan koçların döl verim parametrelerinin daha iyi olacağı ve özellikle morfometrik testis ölçümleri ile spermatolojik özellikler arasındaki korelasyon bulguları birlikte değerlendirildiğinde koçların dölverimi güçlerinden daha yüksek oranda yararlanılabileceği kanısına varıldı.

Bununla birlikte bir koçtan elde edilen yavru sayısı dişiye oranla çok daha yüksek olduğundan üzerinde durulan verim özelliği bakımından yüksek değere sahip genotiplerin oluşturulmasında kullanılacak erkek materyalin seçiminde özellikle spermatozoon DNA hasarı düzeyinde araştırmaların yapılmasının önemli olduğu ve özellikle halk elindeki koyunların Haziran ve Temmuz aylarında başlanan koç katımı mevsiminde artan spermatozoon DNA hasarı nedeniyle dölverimi kayıplarının olup olmadığının daha kapsamlı araştırmalar ile desteklenmesinin yararlı olacağı, spermatozoon DNA hasarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin klinik kullanımının yaygınlaştırılması ve özellikle COMET

analiz yönteminin daha pratik kullanılabilirliği için yöntemin modifiye çalışmalarının sürdürülmesi ile elde edilecek gelişmeler daha sonraki çalışmalara ışık tutacaktır.

#### KAYNAKLAR

- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA.** Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* 2003; 79:829-843.
- Ahmadi A, Ng SC.** Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999; 284(6): 696-704.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A.** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology.* 2002; 57:1801-1808.
- Aksoy M, Ataman MB, Karaca F, Kaya A.** Merinos Koçlarda Testisin Morfometrik Ölçüleri ve Sperma Kalitesi Arasındaki İlişkinin Araştırılması. *Vet. Bil. Derg.* 1994; 10 (1-2):111-112.
- Ataman MB, Kaya A, Karaca F, Yıldız C, Çoyan K, Ergin A, Aksoy M.** Toklularda Testisin Sezon İçi ve Sezon Dışı Morfometrik Ölçüleriyle Spermatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Belirlenerek Damızlık Seçiminde Kullanılabilirliğinin Araştırılması. *Hay. Araş. Derg.* 1996; 6(1-2):1-7.
- Bucak MN, Tekin N.** Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rum Res.* 2007; 73:103-108.
- Bucak MN, Tekin N, Kulaksız R.** Koç spermasının kısa süreli saklanması antioksidanların etkisi. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.* 2007;47(2):15 – 21.
- Cebesoy FB, Ünlü C, Aydos K, Baltacı V.** Sperm morfolojisi ve acridine orange boyamanın ICSP'deki fertilizasyon oranları ve embriyo kalitesi ile ilişkisi. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2006; 7(2):110-114.
- Chan PJ, Corselli JU, Patton WC, Jacobson JD, Chan SR, King A.** A simple comet assay for archived sperm correlates DNA fragmentation to reduced hyperactivation and penetration of zona-free hamster oocytes. *Fertil Steril.* 2001; 75(1):186-192.
- Collins AR.** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004; 26:249-261.
- Demirci E.** Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Suni Tohumlama ve Androloji Ders Notları. No: 53, F.Ü. Vet. Fak. Ders Teksiri. Elazığ. 2002.
- Ding XP, Yan SW, Zhang N, Tang J, Lu HO, Wang XL, Tang Y.** A cross-sectional study on nonionizing radiation to male fertility. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 2004; 25 (1):40-43.
- Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW.** Candidate Reference Method for Determination of Total Bilirubin Serum: Development and Validation. *Clin. Chem.* 1985; 31(11):1779-1789.
- Dufour JJ, Fahmy M.H, Minvielle F.** Seasonal Changes in Breeding Activity, Testicular Size, Testosterone Concentration and Seminal Characteristics in Ram With Long or Short Breeding Season. *J. of Anim. Sci.* 1984; 58(2):416-422.
- Elmaz Ö, Cirit Ü, Demir H.** Relationship of testicular development with age, body weight, semen characteristics and testosterone in Kivircik ram lambs. *S A Journal of Animal Science.* 2007; 37(4): 269-274.
- Evans G, Maxwell WMC.** Salomon's Artificial Insemination of Sheep and Goat, Ed. G Evans and WMC Maxwell, Butterworths Pty Limited, Australia. 1987.
- Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP.** Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod.* 1999; 14(4):1039-1049.
- Fallah-Rad AH, Connor ML, Del Vecchio RP.** Effect of transient early hyperthyroidism on onset of puberty in Suffolk ram lambs. *Reproduction.* 2001; 121:639-646.
- Foster AR, Laads WP, Hoffman D, Briggs GD.** The relationship of scrotal circumference to testicular weight in rams. *Aust. Vet. J.* 1989; 66:20-22.
- Fraser L, Strzezek J.** The use of comet assay DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochemica Et Cytobiologica.* 2004; 42(1):49-50.
- Fukui Y, Togawa M, Abe N, Takano Y, Asada M, Okada A, Iida K, Ishikawa H, Ohsumi S.** Validation of the sperm quality analyzer and the hypo-osmotic swelling test for frozen-thawed ram and Minke Whale (*Balaenoptera bonarensis*) Spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 2004; 50:147-154.
- Gabryszuk M, Czauderna M, Baranowski A, Strzałkowska N, Józwick A, Krzyżewski J.** The effect of diet supplementation with Se, Zn and vitamin E on cholesterol, CLA and fatty acid, contents of meat and liver of



- lambs. Anim. Sci. Pap. Rep. 2007; 25(1):25-33.
- Garcia-Macias V, Martinez-Pastor F, Alvarez M, Borrigan S, Chamorro CA, Soler AJ, Anel L, de Paz P.** Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and Brown Bear (*Ursus arctos*). J Androl. 2006; 27(6):837-846.
- Gliozzi TM, Stacchezzini MC, Arrighi S, Cremonesi F.** Seasonal variation of DNA integrity assessed by comet assay in buffalo (*Bubalus Bubalis*). Reprod Dom Anim Sci. 2006; 41:311 (p3).
- Gündoğan M.** Koçların Testis Ölçülerinin Spermatolojik Özellikler ve Kan Serumu Testesteron Miktarları ile İlişkisi. Hay. Araş. Derg. 1999; 9(1-2):49-52.
- Gündoğan M.** Some Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents in Relation to Season in Akkaraman and Awassi Rams. Türk J. Vet. Anim. Sci. 2006; 30(1):95-100.
- Gündoğan M.** Seasonal variation in serum testosterone, T<sub>3</sub> and andrological parameters of two Turkish sheep breeds. Small Rum. Res. 2007; 67:312-316.
- Gündoğan M.** Short term preservation of ram semen with different extenders. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg. 2009;15(3):429-435.
- Gündoğan M, Baki D, Yeni D.** Reproductive Seasonality in Sheep. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A -Animal Science. 2003;53(4):175-179
- Gündoğan M, Elitok B.** Seasonal Changes in Reproductive Parameters and Seminal Plasma Constituents of Rams in Afyon Province of Turkey. Deuth. Tierärztl. Woch., 2004; 111(4):158-161.
- Gündoğan M, Demirci E.** Monthly Changes in Some Reproductive Parameters and in Testosterone and Thyroxine Values of Rams Throughout One Year Under Continental Climate Conditions. Deuth. Tierärztl. Woch. 2003; 110:450-453.
- Gündoğan M, Serteser M.** Some Reproductive Parameters and Biochemical Properties in Akkaraman and Awassi Rams. Türk J. Vet. Anim. Sci. 2005; 29(3):595-599.
- Gündoğan M, Tekerli M.** Sıcaklığın Dölverimine Etkisi (Derleme). Türk Vet. Hek. Derg. 2004; 16(1-2):68-69.
- Gündoğan M, Uçar M, Tekerli M.** Afyon Koşullarında Yetiştirilen Koçlarda Aşım Sezonu Öncesi, Esnası ve Sonrasında Testislerin Morfometrik Ölçümleri ile Diğer Spermatolojik Özellikler Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg. 2003; 43(1):9-22.
- Gündoğan M, Yeni D, Uçar M, Özenç E.** Relationships Between Some Reproductive Parameters and Biochemical Properties of Blood Serum in Rams. Arch. Androl. 2004; 50(6):387-390.
- Gündüz H, Mert N.** Farklı ırklardaki ithal etçi koyunlarda serum lipoprotein düzeyleri. Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg. 1997; 8 (1-2):25-27.
- Hafez ESE.** Reproduction in Farm Animals. Lea & Febiger (5nd edition). Philadelphia, 1987; 455-480.
- Hafez Y.M.** Semen quality and relevant blood plasma parameters of Rahmani rams fed different dietary energy levels. Archiva Zootechnica. 2009; 12 (3):64-72.
- Huang CC, Lin DPC, Tsao HM, Cheng TC, Liu CH, Lee MS.** Sperm DNA fragmentation negatively correlates with velocity and fertilization rates but might not affect pregnancy rates. Fertil. Steril. 2005; 84(1):130-140.
- Hughes CM, Lewis SE, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** Reproducibility of human sperm DNA measurements using the alkaline single cell gel electrophoresis assay. Mutat Res. 1997; 374(2): 261–268
- Jeyendran RS, Van der Ven HH, Zaneveld LJD.** The hypoosmotic swelling test: An update. Arch. Androl. 1992; 29:105-116.
- Karagiannidis A, Varsakeli S, Alexopoulos C, Amarantidis I.** Seasonal variation in semen characteristics of Chios and Fresian rams in Greece. Small Rum. Res. 2000; 37:125-130.
- Karahan İ, Pirinççi İ, Ateşşahin A, Gürsu F, Çıkım G, Güler O.** Koçlarda indometasin, furosemid ve prostaglandin F<sub>2</sub> Alfa'nın troid hormon düzeyleri üzerine etkileri. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2002; 26:1375-1380.
- Kasimanickam R, Pelzer KD, Kasimanickam V, Swecker WS, Thatcher CD.** Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. Theriogenology. 2006;65:1407–1421.
- Kaya A, Yıldız C, Lehimcioğlu NC, Ergin A, Aksoy M.** Konya Merinos Koçlarında Sperma Kalitesi, Testis Ölçüleri ve Kan Testesteron Düzeylerine İlişkin Mevsimsel Değişikliklerin Araştırılması. Hay. Araş. Derg. 1999; 9(1-2):1-5.
- Kishk WH.** Interrelationship between ram plasma testosterone level and some semen characteristics. Slovak J. Anim. Sci. 2008; 41:67-71.
- Koyuncu M., Şengül L., Tuncel E.** Karayaka toklularında bazı testis özellikleri. Hayvansal Üretim. 2000; 41:102-107.

- Koyuncu, M., Kara Uzun Ş, Öziş Ş, Duru S.** Kıvrıkcık Kuzularında Bazı Testis Özellikleri. *J. Agric. Sci.* 2005; 11(1):7-11
- Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF.** Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998; 69(3):528-32.
- Lopez-Fernandez C, Fernandez JL, Gosalbez A, Arroyo F, Vázquez JM, Holt WV, Gosálvez J.** Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. *Ram. Theriogenology.* 2008; 70(6):898-908.
- Lough DS, Solomon MB, Rumsey TS.** Effects of dietary canola seed and soy lecithin in high-forage diets on performance, serum lipids, and carcass characteristics of growing ram lambs. *J Anim Sci.* 1991; 69:3292-3298.
- Marai F.M., El-Darawany A.A., Abou-Fandoud E.I., Abdel-Hafez M.A.M.** Reproductive and physiological traits of Egyptian Suffolk rams as affected by selenium dietary supplementation during the sub-tropical environment of Egypt. *Livest Res Rural Dev.* 2009; **21(3): 1-12.**
- Mehmetoğlu I.** Klinik Biyokimya Laboratuvarı El Kitabı (2nd ed). Yelken Yayınları, Konya. 2002.
- Mert H, Karakuş K, Yılmaz A, Aygun T, Mert N, Apaydın B, Seyhan E.** Effect of genotype on testis, quality and mineral composition of semen in various ram breeds. *Biol. Trace. Elem. Res.* 2009; 132 93-102.
- Moskovtsev SI, Willis J, Azad A, Mullen JBM.** Sperm DNA integrity: correlation with sperm plasma membrane integrity in semen evaluated for male infertility. *Arch Androl.* 2005; 51:33-40.
- Nisbet C, Yarım GF, Çiftçi G.** Sağlıklı Karayaka ırkı koyunlara ait bazı serum biyokimyasal değerleri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2006; 53:57-59.
- Ollero M, Cebrian-Perez JA, Muino-Blanco T.** Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *J Androl.* 1997;18(6):732-739.
- Pinto CRF, Kozink DM.** Simplified hypoosmotic swelling testing (HOST) of fresh and frozen-thawed canine spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2008;104:450-455.
- Raghuvansi SKS, Tripathi MK, Mishra AS.** Feed digestion, rumen fermentation and blood biochemical constituents in Malpura rams fed a complete feed-block diet with the inclusion of tree leaves. *Small Rum. Res.* 2007;71:21-30.
- Rosa HJD, Bryant MJ.** Seasonality of reproduction in sheep. *Small Rum. Res.* 2003;48:155-171.
- Sakkas D, Manicardi GC, Bizzaro D.** Sperm nuclear DNA damage in the human. *Adv Exp Med Biol.* 2003;518:73-84.
- Salhab SA, Zarkawi M, Wardeh MF, Al-Masri MR, Kassem R.** Characterization and evaluation of semen in growing Awassi ram lambs. *Trop Anim Health Prod.* 2003; 35:455-463.
- Smith R, Kaune H, Parodi D.** Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. *Human Reproduction* 2006; 21(4):986-993
- Song GJ, Norkus EP, Lewis V.** Relationship between seminal ascorbic acid and sperm DNA integrity in infertile men. *International J Androl* 2006; 29:569-575.
- Souza MIL, Bicudo SD, Uribe-Velásquez LF, Ramos AA.** Circadian and circannual rhythms of T3 and T4 secretions in Polwarth-Ideal rams. *Small Rum Res.* 2002; 46:1-5.
- Spano M, Bonde JP, Hjollund HI, Kolstad HA, Cordelli E, Leter G.** Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil Steril.* 2000; 73(1):43-50.
- Taha TA, Abdel-Gawad EI, Ayoub MA.** Monthly variations in some reproductive parameters of Barki and Awassi rams throughout 1 year under subtropical conditions I. Semen characteristics and hormonal levels. *Anim. Sci.* 2000; 71:317-324.
- Tajangookeh HD, Shahneh AZ, Shahrehabak MM, Shakeri M.** Monthly variation of plasma concentrations of testosterone and thyroid hormones and reproductive characteristics in three breeds of iranian fat-tailed rams throughout one year. *Pakistan J Biol Sci.* 2007;10 (19):3420-3424.
- Tekin N.** Spermanın Muayenesi ve Değerlendirilmesi. In: Alaşam, E. Ed. *Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyonun Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite.* Dizgiyevi, Konya. 1994; 69-79.
- Türk G, Demirci E.** Akkaraman Koçların Serum Testesteron Düzeylerinde ve Spermatogenesisindeki Mevsime Bağlı Değişikliklerin Araştırılması. I. Spermatoljik Özelliklerle Testesteron Miktarı Arasındaki İlişki. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 2005; 19(1):21-27.
- Twigg J, Irvine DS, Houston P, Fulton N, Michael L, Aitken RJ.** Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective

- significance of seminal plasma. *Mol Hum Reprod.* 1998; 4:439–445.
- Yılmaz A, Cengiz F.** Norduz erkek kuzularında bazı üreme özellikleri arasındaki korelasyonlar. *J. Agric. Sci.* 2006; 16(1):69-75.
- Zamiri MJ, Khodaei HR.** Seasonal thyroidal activity and reproductive characteristics of Iranian fat-tailed rams. *Anim Reprod. Sci.* 2005;88:245–255.
- Zamiri MJ, Rezaei-Roodbari A.** Relationship between blood physiological attributes and carcass characteristics in Iranian fat-tailed sheep. *Iranian Journal of Science & Technology.* 2004; 28(1):97-106.
- Zar JH.** *Biostatistical Analysis.* Prentice-Hall Inc. Englewood Cliffs (2nd ed), New Jersey. 1984.

## İnfeksiyonların Tanısında En Çok Kullanılan İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri

Mehmet ÜVEY<sup>1</sup>, Nilgün ÜNAL<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> *Aniagen Anadolu Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı, Ankara, Türkiye.*

<sup>2</sup> *Kırkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kırkkale, Türkiye.*

\*Corresponding author e-mail: nilkarakaya@hotmail.com

### ÖZ

Nükleik asit amplifikasyonu, enfeksiyonların, tümörlerin, genetik anormalliklerin tanısında ve adli tıpta en fazla kullanılan yöntemlerdendir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) metoduna göre sabit sıcaklıkta yapılmasıyla karmaşıklığı azaltır. Bu yöntemler, kullanılan enzim çeşitliliği, primerler, duyarlılıkları ile özgüllükleri bakımından farklılıklar göstermektedir. Bu derlemede izotermal amplifikasyon yöntemlerinden en sık kullanılanları, prensipleri, kullanım alanları ve getirdikleri yenilikler ele alınmıştır.

**Anahtar kelimeler:** İzotermal Amplifikasyon, LAMP, NASBA, SDA, EXPAR

### Isothermal Amplification Methods Most Used in the Diagnosis of Infections

#### ABSTRACT

Isothermal amplification of nucleic acid is one of the most commonly used methods to identify the infections, tumors, genetic abnormalities, and in forensic medicine. As isothermal amplification methods can be performed at one reaction temperature under simple conditions they are less complex in comparison to Polymerase Chain Reaction (PCR). These methods differ from each other with the diversity of enzymes, primers used, sensitivity and specificity. In this review, the most commonly used isothermal amplification methods, their principles, areas of use and innovations brought about are discussed.

**Keywords:** Isothermal Amplification, LAMP, NASBA, SDA, EXPAR

*To cite this article: Üvey M, Ünal N. İnfeksiyonların Tanısında En Çok Kullanılan İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri. Kocatepe Vet J. (2018) 11(1): 86-95.*

## GİRİŞ

DNA genetik bilgileri depolayan, RNA ise hücre fonksiyonları için gerekli proteinlerin aminoasit dizisini kodlayan hücreler için hayati öneme sahip nükleik asitlerdir (Zhao ve ark. 2015). PCR pek çok alanda kullanılır ve amplifikasyon için ısı sikluslarına ihtiyaç duyulduğundan, thermocycler gibi pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmaktadır (Ünal ve Çınar 2012, Zhao ve ark. 2015). İzotermal amplifikasyon yöntemleriyle, PCR için gerekli olan ısı sikluslarına ihtiyaç duyulmadan sabit ısıda (su banyosu ile sağlanabilen) etkili ve hızlı bir şekilde nükleik asit amplifikasyonu yapılabilmektedir. İzotermal amplifikasyon yöntemleri ve nanoteknoloji kombinasyonlarına ilgi artmış olup bu metotlarla proteinlerin, hücrelerin, küçük moleküllerin ve iyonların tespiti yapılabilmektedir. İlk yıllarda test tüpünde yapılan izotermal amplifikasyon metotları, günümüzde mikro akışkan kanallar, kılcal kanallar ve test kâğıtlarında yapılabilmektedir (Zhao ve ark. 2015).

### **İzotermal amplifikasyon metotları**

Belirlenmiş sabit bir ısıda amplifikasyonun yapıldığı izotermal amplifikasyon metotları, kullanılan enzim, primer, hedef nükleik asit ya da ürüne göre çok sayıda geliştirilmiş olup bu derlemenin amacı sahada en çok kullanım alanı bulunanların prensipleri ile kullanım alanlarının ele alınmasıdır.

Nükleik Asit Dizi Baz Amplifikasyonu (Nucleic Acid Sequence Base Amplification:NASBA)

İplikçik Yer Değiştirme Amplifikasyonu (Strand Displacement Amplification:SDA)

Yuvarlanan Çember Amplifikasyonu (Rolling Circle Amplification: RCA)

İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (Loop Mediated Isothermal Amplification: LAMP)

Helikaz Bağımlı Amplifikasyon (Helicase Dependent Amplification:HDA)

Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (Recombinase Polymerase Amplification: RPA)

Üstel Amplifikasyon Reaksiyonu (Exponential Amplification Reaction: EXPAR)

### **Nükleik Asit Dizi Baz Amplifikasyonu (NASBA)**

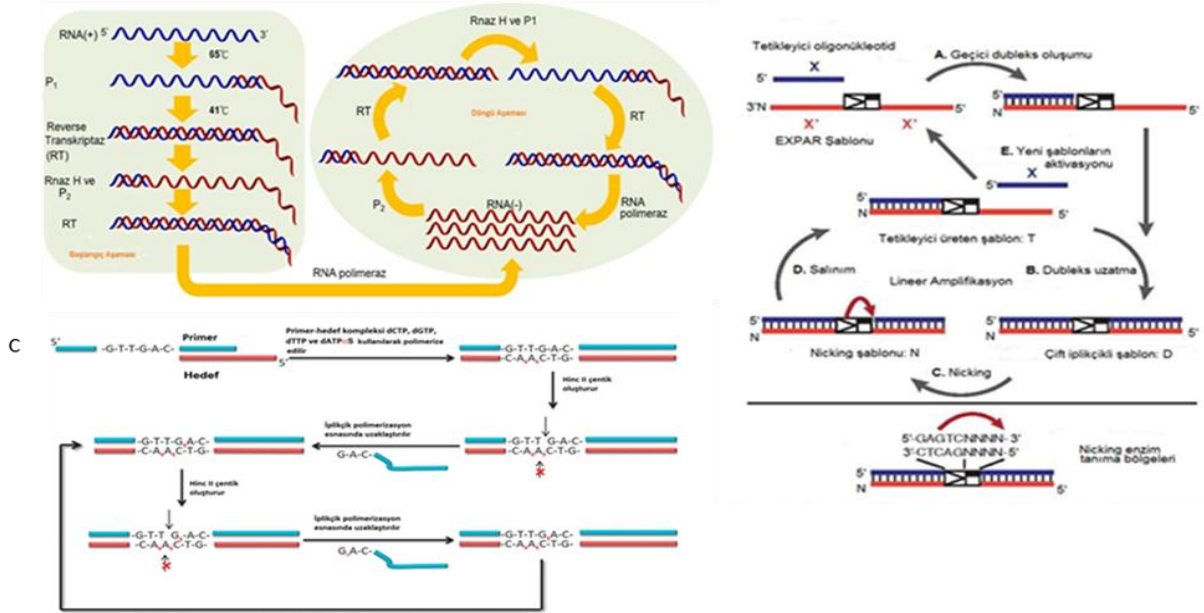
Örneklerdeki bakteriyel ve viral tek iplikçikli RNA'nın belirlenmesi için kullanılmaktadır (Ge ve ark. 2010, Mader ve ark. 2010, Won ve Min 2010, Won ve ark. 2010). Amplifikasyon için karışıma RNA'dan DNA sentezini sağlayan kanatlı Myeloblastosis virüsüne ait reverse transkriptaz

(AMV-RT), RNA-DNA hibridi oluştuğunda bu iplikçikteki RNA'yı parçalayan *E.coli* RnazH ve DNA'dan RNA sentezi sağlayan faj kökenli RNA polimeraz (T7 RNA polimeraz) olmak üzere üç farklı enzim ve ayrıca güçlü promotör bölgesine sahip iki primer ilave edilmektedir. Bu yöntemde kalıp RNA, üzerindeki hedef dizilerin karşılığı olan ve polimeraz promotör dizisi içeren primer I'le bağlanır ve reverse transkriptaz enzimiyle RNA/komplementer DNA (RNA/cDNA) elde edilir (Şekil 1). Daha sonra RnazH enzimiyle RNA parçalanarak cDNA üretilir. cDNA'nın promotör bölgesine primer II bağlanır ve reverse transkriptaz enzimi yardımıyla uzatılarak çift iplikçikli komplementer DNA (dscDNA) üretilir. Çift iplikçikli DNA zincirindeki yeni üretilen iplikçik kalıp RNA'nın homologudur. Üçüncü enzim olan T7 RNA polimeraz da güçlü promotör etkisiyle yüzlerce kopya RNA üretebilir. Üretilen her bir yeni RNA molekülü reverse transkriptaz için kalıp görevi yaparak bir sonraki turu başlatılmış olur. Tüm amplifikasyon reaksiyonu önceden tanımlanmış 41 °C sıcaklıkta gerçekleştirilir (Compton 1991).

NASBA insan ve hayvanlarda virüslerin tespitinde yoğun bir biçimde kullanılmıştır. Kanatlılarda; Newcastle hastalığının izlenmesi ve sürveyans çalışmalarında (Cui ve ark. 2007), Influenza virüsünün (Lau ve ark. 2004) tespiti için, insanlarda; hepatitis C virüs (Damen ve ark. 1999) ve SARS Coronavirüs (Keightley ve ark. 2005) tespitinde kullanıldığı bilinmektedir.

### **İplikçik Yer Değiştirme Amplifikasyonu (SDA)**

Bu yöntemde, kullanılan primerin 5' ucunda bir restriksiyon enzim için özel bölge HincII (5'-GTT// GAC-3') ve hedefi tamamlayıcı bölge olmak üzere iki bölge bulunmaktadır. DNA polimeraz primeri uzatır ve deoksiadenosin 5'-[α-tiyo] trifosfat'ı (dATP[αs]) bünyesine katar (Şekil 1.). Daha sonra restriksiyon endonükleaz HincII enzimi tiyofosfat modifikasyonlarını içeren iplikçikleri ayıramadığından primer iplikçiginde HincII tanıma bölgesinde çentik oluşturarak iplikçigi uzaklaştırır. Endonükleazın etkisiyle 3'-OH açığa çıkar ve DNA polimeraz tarafından uzatılır. Yeni oluşturulmuş iplikçik, HincII için bir çentik bölgesi içermeye devam etmekte olup DNA polimeraz bu işlemi takip eden her sentez için ardışık bir izotermal amplifikasyonuna neden olur (Walker 1993).



**Şekil 1.** A: NASBA (Chang ve ark. 2012), B: EXPAR (Qian ve ark. 2012), C: SDA (Walker ve ark. 1992).  
**Figure 1.** A: NASBA (Chang et al. 2012), B: EXPAR (Qian et al. 2012), C: SDA (Walker et al. 1992).

### Yuvarlanan Çember Amplifikasyonu (RCA)

Phi29 bakteriyofaj polimerazının hedef moleküller üzerindeki iplikçik uzaklaştırma özelliğinden yararlanır (Banér ve ark. 1998, Dean ve ark. 2001). Reaksiyonun gerçekleştirilmesi için çok farklı yaklaşımlar söz konusu olup lineer DNA'lar için başarıyla kullanılan asma kilit şekilli (padlock) problemlerin olduğu yöntem esas alınmıştır (Zhao ve ark. 2008, Johne ve ark. 2009, Conze ve ark. 2010). Bu problemler hibridizasyon ve ligasyonun sonrasında dairesel hale gelmeleri için tasarlanmış ve iki hedef spesifik sekansı içeren lineer oligonükleotidlerdir (Şekil 3.). Ligasyon reaksiyonunda çift tanıma yerinin var olmasıyla oldukça özgüdür. Asma kilit şekilli prob, ürünü sürekli uzatarak iplikçiklerin yerini değiştiren polimeraz için şablon görevi görür (Chang ve ark. 2012).

Çeşitli örneklerde *Salmonella enterica* dizilerinin tespit edilebilmesi amaçlı katı faz RCA tanımlanmış olup, ligasyon sonrasında lineer iplikçiklerin üretilip floresan problemlerle hibridize edilmesi sonucunda tespitin gerçekleştiği bildirilmiştir (Sato ve ark. 2010). Optimize edilmiş RCA sistemleriyle *Listeria monocytogenes*'den yaklaşık 60 molekül genomik DNA'nın tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Murakami ve ark. 2009).

### İlmiğe Dayalı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

Son yıllarda üzerinde en çok araştırma yapılan izotermal amplifikasyon yöntemidir. Umut veren bir yöntem olmasından dolayı çalışmalar en çok yöntemin basitleştirilmesi ve sahaya yönelik kullanımı alanlarındadır (Mori ve ark. 2013). Reaksiyonda hedef bölgeye özgü F3, F2, F1, B1c, B2c ve B3 olarak işaretlenmiş kalıp DNA'daki altı

ayırt edici bölgeyi tanıyabilen 4 primer kullanılmaktadır. Bu primerler biri ileri iç primer (FIP-Forward Inner Primer F2 ve F1c bölgelerini taşıyan) ve biri geri iç primer (BIP-Back Inner Primer B2 ve B1c bölgelerini taşıyan), iki tanede dış primer (outer primers- F3 ve B3)'ler olmak üzere toplam 4 adettir (Notomi ve ark. 2000). Reaksiyon süresinin ortalama 60 dakika olup sadece bir ısı bloğu veya termos benzeri bir ısıtıcı yardımıyla 60-65 °C ısıda yapılabildiği ve çıplak gözle sonuçların görülebileceği son derece özgün ve duyarlı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Parida ve ark. 2008).

Primer tasarımı dikkate alındığında (Şekil 2), FIP ve BIP'in LAMP reaksiyonunda ana rolü oynadığı görülmektedir. "c" tamamlayıcı bir sekansı temsil ettiğinden dolayı, F1c dizisi F1 sekansına tamamlayıcıdır. FIP, F1c ve F2 dizilerinden, BIP, primeri de B1c ve B2 dizilerini taşıyan hibrid primerlerdir. Yapılanma aşamasında, FIP'den başlatılan DNA sentezi şu şekilde ilerler: F2 bölgesi, hedef DNA'nın F2c bölgesiyle bağlanır ve uzamayı başlatır. Benzer bir şekilde, BIP ile de DNA amplifikasyonu devam eder. F3 primeri hedef DNA'nın F3c bölgesiyle kaynaşır ve iplikçik uzaklaştırma DNA sentezi gerçekleşir. FIP'den gelen uzamış DNA iplikçığı yer değiştirerek serbest bırakılır. Serbest tek iplikli formlar 5' ucunda (şekildeki yapı 4) ilmiğe benzer bir döngü yapısı oluşturur (Tomita ve ark. 2008).

Aynı şekilde; tek iplikçikli DNA, BIP ve B3 primerleri bir şablon olarak görev alır ve Şekil 2'deki gibi her iki uçta halter benzeri ilmek yapı (şekildeki yapı 5) oluşturmak için DNA sentezi devam eder.

LAMP metodu bir reverse transkripsiyon aşaması (RT-LAMP) eklenerek sadece DNA'nın değil RNA'nın tespitinde de kullanılabilir (Parida ve ark. 2008). Reaksiyonun kontaminasyona neden olan faktörlerden PCR'a göre daha az etkilendiği ve bu yüzden de klinik örneklerin özel bir saflaştırmaya gidilmeden bile kullanılabilirliği bildirilmiştir (Kaneko ve ark. 2007). LAMP ve RT-LAMP'in yüksek sıcaklık kullanılarak proteinleri parçalayacak bir DNA ve RNA ekstraksiyonu aşamasını da içeren pek çok modifikasyonu mevcut olup tüm modifiye metodlar bir tüp içinde gerçekleştirildiğinden kontaminasyon riskinin son derece düşük olduğu bilinmektedir (Notomi ve ark. 2015).

Tüm olumlu yönlerine karşın modifiye LAMP ve RT-LAMP metodlarının çeşitli virüs türlerine göre reaksiyonun sıcaklık ve süre ihtiyaçlarının farklı olması nedeniyle özellikle de saflaştırılmış nükleik asit kullanıldığında sınırlamaları mevcut olup; herpes virüs tespiti için 96 °C de 5 dakika (Nemoto ve ark. 2011), enterovirüs tespiti için 95 °C de 30 saniye (Nie ve ark. 2012), Avian influenza virüs tespiti için 98-99 °C de 10 dakika (Mahony ve ark. 2013) bu sınırlamalara örnek olarak verilebilecek çalışmalardır. Oluşabilecek sorunların özellikle RNA virüslerinin tespitinde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Jayawardena ve ark. 2007, Nie ve ark. 2012).

LAMP amplifikasyon ürünleri gerçek zamanlı olarak bir turbiditemetre kullanılıp bulanıklığın ölçülmesiyle tespit edilebilir. Bulanıklık, DNA sentezi sırasında ortaya çıkan ve çözünmeyen büyük miktardaki pirofosfat'tan kaynaklanmaktadır (Mori ve ark. 2004). Pirofosfatlar, serbest kalsiyum iyonlarını bağlayan floresan bir metal indikatörü olan kalseinin kullanımıyla LAMP reaksiyonu esnasında gerçek zamanlı olarak da tespit edilebilmektedir (Tomita ve ark. 2008). SYBR Green gibi DNA boyalarının reaksiyona eklenmesi yoluyla tespit edilebildiği rapor edilmiştir (Soliman ve El-Matbouli 2005).

Taşınabilir mini cihazların tespit amaçlı kullanımıyla ilgili çalışmalar yapılmış ve elektrokimyasal sensörlerin entegre edildiği bir LAMP cihazı mikro akışkanlarda kullanılmış olup cihaz; elektrokimyasal olarak DNA bağlayıcı özelliğe sahip metilen mavisinin bağlayıcı özelliğini kullanmaktadır (Hsieh ve ark. 2012).

*Clostridium botulinum* tip A ve B tespitinde de duyarlı bir hızlı test olarak kullanımına dair araştırmalar mevcuttur (Sakuma ve ark. 2009). Özellikle et örneklerinde *Clostridium perfringens* tespitinde (Kaneko ve ark. 2011), *Salmonella* serotiplerinin tespitinde (Zhang ve ark. 2011, Bulut ve ark. 2016), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) enfeksiyonlarının sebebi olan O157, O26 ve O111 serotiplerinin

(Hara-Kudo ve ark. 2008a, Hara-Kudo ve ark. 2008b), yine Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC) O26, O45, O103, O111, O121 ve O145 serotiplerinin (Wang ve ark. 2012), Melioidosis etkeni olan *Burkholderia pseudomallei*'nin (Chantratita ve ark. 2008), *Brucella spp.*'nin (Ohtsuki ve ark. 2008), *Streptococcus pyogenes*'in (Altındış ve ark. 2017) LAMP kullanılarak hızlı ve etkin tespitine yönelik araştırmalar bulunmaktadır.

Kanatlılarda İnfeksiyöz Bursal Hastalık Virusunun (IBDV) (Chen ve ark. 2010, Tsai ve ark. 2012), Marek hastalığı serotip 1'inin (Angamuthu ve ark. 2012), İnfeksiyöz laryngotracheitis virusunun (ILTV) (Xie ve ark. 2010), Newcastle Hastalığı virusunun (NDV) (Li ve ark. 2009), *Mycoplasma synoviae*'nin (Kursa ve ark. 2015), *Mycoplasma gallisepticum*'un (Zhang ve ark. 2015), tavukları infekte eden *Eimeria* türlerinin (Barkway ve ark. 2015) belirlenmesinde sahada güvenilir bir metod olarak kullanılabilirliği bildirilmiştir.

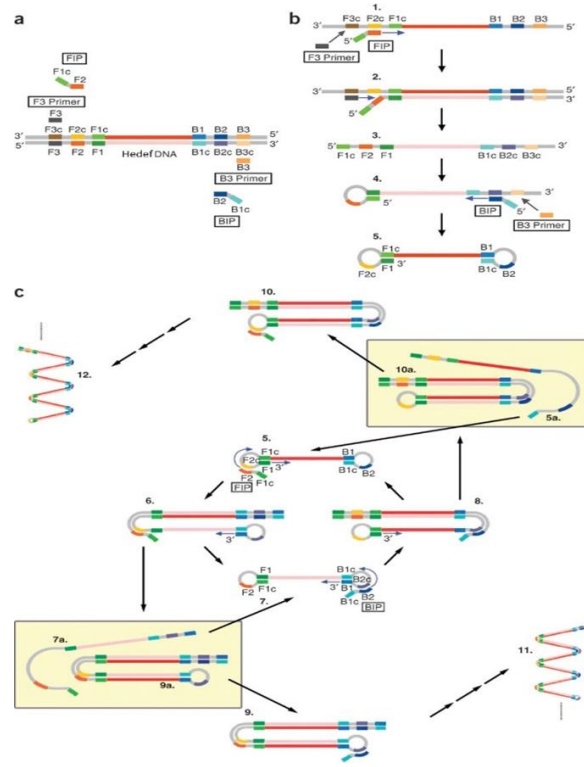
### Helikaz Bağımlı Amplifikasyon (HDA)

DNA helicaz, DNA polimeraz ve birden çok ssDNA binding proteinin uyum içinde çalışmasını gerektiren bir amplifikasyon türüdür. Birinci aşamada helicaz enzimi şablonun üzerine yüklenir ve hedef DNA boyunca ilerleyerek iki iplikçiyi birbirine bağlayan hidrojen bağlarını ayırıp tek iplikçikli yapıyı ortaya çıkartır (Şekil 3). Tek iplikçikli DNA'ya bağlanan (ssDNA binding) proteinler hibridizasyonu önleyerek, helicaz tarafından açığa çıkartılan tek iplikçik yapılara primerlerin bağlanmasına yardımcı olur. İkinci aşamada DNA polimeraz her primerin 3' ucunu serbest deoksiniükleotidleri (dNTP) kullanıp uzatarak iki DNA kopyası oluşturur. Üçüncü aşamada kopyalanmış olan DNA'lar bir öncekinden bağımsız olarak bir sonraki HDA döngüsüne katılıp üstel amplifikasyona sebep olurlar (Cao ve ark. 2013).

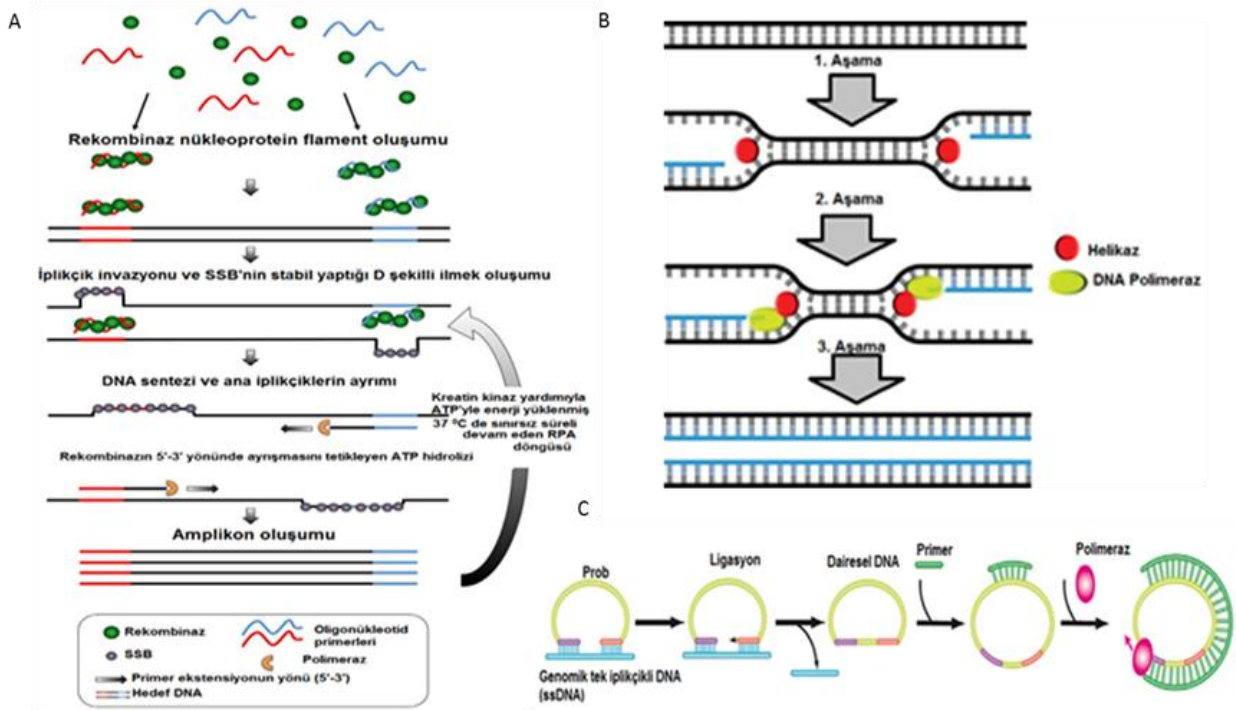
Burun sıvabı örneklerinde *Staphylococcus aureus*'un DNA gen dizisini yakalamak için hibridize edilmiş problarla HDA tekniği kullanılarak tespitine ilişkin araştırmalar mevcuttur (Frech ve ark. 2012).

Ayrıca, Herpes simplex virus 1 ve 2'nin tespitinde (Kim ve ark. 2011, Tong ve ark. 2012). *Clostridium difficile* kaynaklı ishallerin etiyolojik analizinde (Chow ve ark. 2008), Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*'un (MRSA) *mec A* ve *nuc* genlerinin tespitinde (Goldmeyer ve ark. 2007). *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi cinsel yolla bulaşan çok önemli iki hastalık etkeninin multipliks HDA yardımıyla belirlenmesinde kullanımına yönelik çalışmalar vardır (Doseeva ve ark. 2011).





Şekil 2. LAMP reaksiyonu (Tomita ve ark. 2008)  
Figure 2. LAMP reaction (Tomita et al. 2008)



Şekil 3. A: RPA (Daher 2015), B: HDA (Lemieux ve ark. 2012), C: RCA (Tröger ve ark. 2015)  
Figure 3. A: RPA (Daher 2015), B: HDA (Lemieux et al. 2012), C: RCA (Tröger et al. 2015)

### Rekombinaz Polimeraz Amplifikasyonu (RPA)

RPA tekniği, rekombinazlar, primer ve problemlerin kullanılarak, nükleoprotein filamentlerinin oluşturulduğu ve bu filamentlerin aracılık ettiği bir

tekniktir. Bu filamentler homolog dizileri aramak üzere çift iplikçikli DNA (dsDNA) hedeflerini

tarar. Homolog bulunduğu, filament tek iplikçikli DNA'yı bağlayan protein tarafından

stabilize edilmiş çift iplikçikli DNA'da D şekilli ilmek yapısını oluşturur (Şekil 3). ATP hidrolizi ile rekombinazın nükleoprotein filamentinden ayrılması ve böylece polimeraz enziminin primerle bağlanması ve uzaması sağlanır. Oluşan dubleksler RPA döngüsünün başka bir turu için kullanılır. Sonuç olarak bu amplifikasyon metoduyla sınırsız olarak kendini devam ettirebilen RPA döngüsü gerçekleştirilir (Piepenburg ve ark. 2006).

Klinik örneklerde Leptosirozis'in teşhisine yönelik hızlı RPA testi üzerinde çalışmalar mevcuttur (Ahmed ve ark. 2014). Yine şap hastalığı etkeni olan Picornaviridae ailesinin *Aphthovirus* türüne ait şap virüsünün (FMDV) tespiti amaçlı reverse transkripsiyon RPA geliştirilmiş olup taşınabilir bir real time tarayıcıyla sadece 10 dakikada teşhis yapılabildiği rapor edilmiştir (El Wahed ve ark. 2013). Yine Middle Eastern Respiratory Syndrome (MERS) etkeni olan *Coronavirus* tespiti amaçlı RPA bazlı kitler hakkında çalışmalar mevcuttur (Sharma ve ark. 2014).

### Üstel Amplifikasyon Reaksiyonu (EXPAR)

Kısa oligonükleotidlerin 55 °C'de amplifikasyonu esasına dayanan EXPAR metodunda (Van Ness ve ark. 2003) hedef genomik DNA'nın spesifik bölgelerinden enzimatik olarak oluşturulmuş ve tetikleyici X olarak adlandırılan oligonükleotidler

reaksiyonu başlatır (Tan ve ark. 2007). Tetikleyici X oligonükleotidinin amplifikasyonunu, reaksiyonda oluşan EXPAR amplifikasyon şablonu kolaylaştırır. Tetikleyici X oligonükleotidi amplifikasyon şablonunun 3' ucundaki tanıma dizisine geçici olarak bağlanır ve sekans DNA polimeraz tarafından en üstteki iplikçikte 5'-GAGTCNNNN-3' çentik atan enzim tanıma alanı oluşturularak uzatılır (Şekil 1). En üstteki iplikçik çentik atan endonükleaz Nt.BstNBI yardımıyla ayrılır. Reaksiyonun gerçekleştiği 55 °C'de amplifikasyon şablonundan yeni oluşan tetikleyiciler salınır. Tetikleyici üreten şablon yeniden lineer amplifikasyon döngüsüne katılarak dubleks uzatma, çentik atma ve salınma aşamalarıyla yeni tetikleyici oligonükleotidler oluşturulur. Oluşan bu oligonükleotidler de ilave şablonların oluşmasına yardımcı olarak tetikleyici X oligonükleotidinde bir çoğalma meydana getirir (Tan ve ark. 2008).

Şimdilik EXPAR metodunun en uygun kullanım alanı mikroRNA'ların tespiti olarak görülmekte olup çeşitli geliştirmeler yapılarak biyolojik örneklerdeki genomik DNA'nın tespiti yapılarak mutasyonlar, genotiplendirme ve patolojen etken belirleme gibi alanlarda daha yaygın olarak kullanımının hedeflendiği bildirilmiştir (Jia ve ark. 2010).

**Tablo 1.** Önemli İzotermal Amplifikasyon Yöntemleri (Zhao ve ark. 2015)

**Table 1.** Important Isothermal Amplification Methods (Zhao et al. 2015)

Metod	Gerekli enzimler	Primer	Isı (°C)	Reaksiyon zamanı	Hedef	Amplikon	Verim
<b>NASBA</b>	Reverstranskriptaz ve RNA polimeraz (RNaz H)	2	~41	1.5-2	RNA (DNA)	RNA, DNA	10 <sup>6</sup> -10 <sup>9</sup>
<b>SDA</b>	DNA polimeraz, NEaz	2 veya 4	37	2	DNA	dsDNA	10 <sup>7</sup>
<b>RCA</b>	DNA polimeraz, NEaz	0	60	1-3	DNA (RNA)	DNA	Genomik DNA'nın yaklaşık 60 kopyası
<b>LAMP</b>	DNA polimeraz	4	60-65	<1	DNA	DNA	10 <sup>9</sup>
<b>HDA</b>	DNA polimeraz, helikaz	2	37-65	0.5-2	DNA	DNA	10 <sup>7</sup>
<b>RPA</b>	DNA polimeraz, Rekombinaz	2	37-42	0.5-1,5	DNA	DNA	Genomik DNA'nın yaklaşık 10 kopyası
<b>EXPAR</b>	DNA polimeraz, NEaz	0	~60	<0.5	DNA/ RNA	DNA	10 <sup>6</sup> -10 <sup>8</sup>

## SONUÇ

Son yirmi yılda; nükleik asitlerin basit ve hızlı bir şekilde ve oldukça yüksek bir hassasiyetle tespit edilmesi amacıyla çeşitli izotermal nükleik asit amplifikasyon teknikleri ardi ardına geliştirilmiştir. Biyoteknoloji, kimya ve nanoteknolojideki hızlı gelişmelerden yararlanan bu izotermal yöntemler hedefleri genişletilerek DNA ve RNA kadar

hücreler, proteinler, küçük moleküller ve hatta iyonları tespit etmek için de kullanılabilir olmuştur. Bu uygulamaların sekanslama, in situ ya da hücre içi biyogörüntüleme de kullanılabilirliği de fazlasıyla gösterilmiştir. Ayrıca, izotermal amplifikasyonun mikro sistemlere ve taşınabilir cihazlara entegrasyonu nükleik asit bazlı saha teşhislerinin yüksek hassasiyetle yapılmasını kolaylaştırmıştır.

Son yıllarda izotermal amplifikasyon yöntemlerinde önemli gelişme ve iyileşmeler sağlanmasına rağmen, hala bu teknolojilerin geliştirilebileceği alanlar mevcuttur. İzotermal reaksiyonların başlangıç noktasını ayarlamak için kontrol işlemlerinin yapılması (örneğin, bir ısı aktivasyonu aşaması) test performansı ve kantitatif potansiyelini artırmak için önemli bir etkiye sahiptir. Sonuç olarak, izotermal amplifikasyon teknolojilerinin moleküler tanının geleceğinde önemli ve büyüyen bir role sahip olduğu açıktır.

## KAYNAKLAR

- Ahmed A, Van Der Linden H, Hartskeerl RA.** Development of a recombinase polymerase amplification assay for the detection of pathogenic *Leptospira*. Int J Environ Res Public Health. 2014; 11:4953-4964.
- Altındış M, Elmas M, Kılıç Ü, Aslan F G, Küçükpara G, Köroğlu M.** Grup A Streptokokların hızlı moleküler tanısında loop-mediated isothermal amplification PCR (LAMP-PCR). J Biotechnol Strategic Health Res. 2017;1:11-16.
- Angamuthu R, Baskaran S, Gopal DR, Devarajan J, Kathaperumal K.** Rapid detection of the marek's disease viral genome in chicken feathers by loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2012; 50:961-965.
- Banér J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U.** Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. Nucleic Acids Res. 1998; 26: 5073-5078.
- Barkway CP, Pocock RL, Vrba V, Blake DP.** Loop-mediated isothermal amplification (lamp) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens. JoVE. 2015:e52552.
- Bulut E., Köker M. P., Ünal N., Yildirim M.** *Salmonella enterica*'nın LAMP ile belirlenmesi XII. Ulusal Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), Kongre Özet Kitabı p: 47-48 pp., 30 Ağustos-02 Eylül 2016 Kapadokya, Nevşehir, 2016.
- Cao Y, Kim H-J, Li Y, Kong H, Lemieux B,** (2013) Helicase-dependent amplification of nucleic acids current protocols in molecular biology. Eds: John Wiley & Sons, Inc., p: 15.11.01-15.11.012.
- Chang C-C, Chen C-C, Wei S-C, Lu H-H, Liang Y-H, Lin C-W.** Diagnostic devices for isothermal nucleic acid amplification. Sensors. 2012; 12: 8319-8337.
- Chantratita N, Meumann E, Thanwisai A, Limmathurotsakul D, Wuthiekanun V, Wannapasni S, Tumapa S, Day NPJ, Peacock SJ.** Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *tts1* gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. J Clin Microbiol, 2008; 46: 568-573.
- Chen H-T, Zhang J, Ma Y-P, Ma L-N, Ding Y-Z, Liu X-T, Cai X-P, Ma L-Q, Zhang Y-G, Liu Y-S.** Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of infectious bronchitis virus in infected chicken tissues. Mol Cell Probes. 2010; 24:104-106.
- Chow WHA, McCloskey C, Tong Y, Hu L, You Q, Kelly CP, Kong H, Tang Y-W, Tang W.** Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. J Mol Diagn. 2008; 10:452-458.
- Compton J.** Nucleic acid sequence-based amplification. Nature. 1991; 350:91-92.
- Conze T, Göransson J, Razzaghian HR, Ericsson O, Öberg D, Akusjärvi G, Landegren U, Nilsson M.** Single molecule analysis of combinatorial splicing. Nucleic Acids Res. 2010; 38:e163-163.
- Cui S-J, Fung Y-WW, Lau LT, Liu W-B, Wang Y-F, Tong G-Z, Chen J, Yu ACH.** Detection of Newcastle disease virus using nucleic acid sequence-based amplification. Biologicals. 2007; 35:13-18.
- Daher RK.** Recombinase polymerase amplification technology: Assessment for nucleic acid-based point-of-care diagnostics, Doktora Tezi (Ph.D.), L'Université Laval, Québec, Canada, 2015.
- Damen M, Sillekens P, Cuypers H, Frantzen I, Melsert R.** Characterization of the quantitative HCV NASBA assay. J Virol Methods. 1999; 82:45-54.
- Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS.** Rapid amplification of plasmid and phage DNA using phi29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. Genome Res. 2001; 11: 1095-1099.
- Doseeva V, Forbes T, Wolff J, Khripin Y, O'neil D, Rothmann T, Nazarenko I.** Multiplex isothermal helicase-dependent amplification assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 71:354-365.
- El Wahed AA, El-Deeb A, El-Tholoth M, El**

- Kader HA, Ahmed A, Hassan S, Hoffmann B, Haas B, Shalaby MA, Hufert FT.** A portable reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *PloS one*. 2013; 8:e71642.
- Frech GC, Munns D, Jenison RD, Hicke BJ.** Direct detection of nasal *Staphylococcus aureus* carriage via helicase-dependent isothermal amplification and chip hybridization. *BMC Res Notes*. 2012; 5:430.
- Ge Y, Cui L, Qi X, Shan J, Shan Y, Qi Y, Wu B, Wang H, Shi Z.** Detection of novel swine origin influenza A virus (H1N1) by real-time nucleic acid sequence-based amplification. *J Virol Methods*. 2010; 163:495-497.
- Goldmeyer J, Kong H, Tang W.** Development of a Novel One-Tube Isothermal Reverse Transcription Thermophilic Helicase-Dependent Amplification Platform for Rapid RNA Detection. *J Mol Diagn*. 2007; 9:639-644.
- Hara-Kudo Y, Konishi N, Ohtsuka K, Hiramatsu R, Tanaka H, Konuma H, Takatori K.** Detection of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157 and O26 in food by plating methods and LAMP method: A collaborative study. *Int J Food Microbiol*. 2008a; 122:156-161.
- Hara-Kudo Y, Niizuma J, Goto I, Iizuka S, Kaji Y, Kamakura K, Suzuki S, Takatori K.** Surveillance of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef with effective procedures, independent of serotype. *Foodborne Pathogen Dis*. 2008b; 5:97-103.
- Hsieh K, Patterson AS, Ferguson BS, Plaxco KW, Soh HT.** Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic dna at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Angewandte Chemie*. 2012; 124:4980-4984.
- Jayawardena S, Cheung CY, Barr I, Chan KH, Chen H, Guan Y, Peiris J, Poon L.** Loop-mediated isothermal amplification for influenza A (H5N1) virus. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13:899.
- Jia H, Li Z, Liu C, Cheng Y.** Ultrasensitive detection of microRNAs by exponential isothermal amplification. *Angew Chem Int Ed*. 2010; 49: 5498-5501.
- Johne R, Müller H, Rector A, Van Ranst M, Stevens H.** Rolling-circle amplification of viral DNA genomes using phi29 polymerase. *Trends Microbiol*. 2009; 17: 205-211.
- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T.** Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007; 70: 499-501.
- Kaneko I, Miyamoto K, Mimura K, Yumine N, Utsunomiya H, Akimoto S, McClane BA.** Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meat samples by using molecular methods. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:7526-7532.
- Keightley MC, Sillekens P, Schippers W, Rinaldo C, George KS.** Real-time NASBA detection of SARS-associated coronavirus and comparison with real-time reverse transcription-PCR. *J Med Virol*. 2005; 77:602-608.
- Kim H-J, Tong Y, Tang W, Quimson L, Cope VA, Pan X, Motre A, Kong R, Hong J, Kohn D.** A rapid and simple isothermal nucleic acid amplification test for detection of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Clin Virol*. 2011; 50:26-30.
- Kursa O, Woźniakowski G, Tomczyk G, Sawicka A, Minta Z.** Rapid detection of *Mycoplasma synoviae* by loop-mediated isothermal amplification. *Arch Microbiol*. 2015; 197:319-325.
- Lau L-T, Banks J, Aherne R, Brown IH, Dillon N, Collins RA, Chan K-Y, Fung Y-WW, Xing J, Albert C.** Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 313:336-342.
- Lemieux B, Li Y, Kong H, Tang Y-W.** Near instrument-free, simple molecular device for rapid detection of herpes simplex viruses. *Expert Rev Mol Diagn*. 2012; 12:437-443.
- Li Q, Xue C, Qin J, Zhou Q, Chen F, Bi Y, Cao Y.** An improved reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of Newcastle disease virus. *Arch Virol*. 2009; 154:1433-1440.
- Mader A, Riehle U, Brandstetter T, Stickeler E, Zur Hausen A, Rühle J.** Microarray-based amplification and detection of RNA by nucleic acid sequence based amplification. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 397:3533-3541.
- Mahony J, Chong S, Bulir D, Ruyter A, Mwawasi K, Waltho D.** Multiplex lamp (M-LAMP) assay for the detection of

- influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J Clin Virol.* 2013; 58:127-131.
- Mori Y, Kanda H, Notomi T.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development. *J Inf Chemother.* 2013; 19:404-411.
- Mori Y, Kitao M, Tomita N, Notomi T.** Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods.* 2004; 59:145-157.
- Murakami T, Sumaoka J, Komiyama M.** Sensitive isothermal detection of nucleic acid sequence by primer generation–rolling circle amplification. *Nucleic Acids Res.* 2009; 37:e19.
- Nemoto M, Ohta M, Tsujimura K, Bannai H, Yamanaka T, Kondo T, Matsumura T.** Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J Vet Med Sci.* 2011; 73:1225-1227.
- Nie K, Qi S-X, Zhang Y, Luo L, Xie Y, Yang M-J, Zhang Y, Li J, Shen H, Li Q, Ma X-J.** Evaluation of a Direct Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method without RNA extraction for the detection of human enterovirus 71 subgenotype C4 in nasopharyngeal swab specimens. *PLoS ONE,* 2012; 7: e52486.
- Notomi T, Mori Y, Tomita N, Kanda H.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J Microbiol.* 2015; 53:1-5.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28:e63-e63.
- Ohtsuki R, Kawamoto K, Kato Y, Shah MM, Ezaki T, Makino SI.** Rapid detection of *Brucella* spp. by the loop-mediated isothermal amplification method. *J Appl Microbiol.* 2008; 104:1815-1823.
- Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PVL, Morita K.** Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev Med Virol.* 2008; 18:407-421.
- Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA.** DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol,* 2006; 4:e204.
- Sakuma T, Kurosaki Y, Fujinami Y, Takizawa T, Yasuda J.** Rapid and simple detection of *Clostridium botulinum* types A and B by loop-mediated isothermal amplification. *J Appl Microbiol.,* 2009; 106:1252-1259.
- Sato K, Tachihara A, Renberg B, Mawatari K, Sato K, Tanaka Y, Jarvius J, Nilsson M, Kitamori T.** Microbead-based rolling circle amplification in a microchip for sensitive DNA detection. *Lab Chip.* 2010; 10:1262-1266.
- Sharma N, Hoshika S, Hutter D, Bradley KM, Benner SA.** Recombinase-based isothermal amplification of nucleic acids with self-avoiding molecular recognition systems (SAMRS). *Chem Bio Chem,* 2014; 15:2268-2274.
- Soliman H, El-Matbouli M.** An inexpensive and rapid diagnostic method of Koi Herpesvirus (KHV) infection by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol.* 2005; 2:1-8.
- Tan E, Erwin B, Dames S, Ferguson T, Buechel M, Irvine B, Voelkerding K, Niemz A.** Specific versus nonspecific isothermal dna amplification through thermophilic polymerase and nicking enzyme activities. *Biochemistry.* 2008; 47: 9987-9999.
- Tan E, Erwin B, Dames S, Voelkerding K, Niemz A.** Isothermal DNA Amplification with Gold Nanosphere-Based Visual Colorimetric Readout for Herpes Simplex Virus Detection. *Clin Chem.* 2007; 53:2017-2020.
- Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T.** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008; 3:877-882.
- Tong Y, Mccarthy K, Kong H, Lemieux B.** Development and comparison of a rapid isothermal nucleic acid amplification test for typing of herpes simplex virus types 1 and 2 on a portable fluorescence detector. *J Mol Diagn.* 2012; 14:569-576.
- Tröger V, Niemann K, Gärtig C, Kuhlmeier D.** Isothermal amplification and quantification of nucleic acids and its use in microsystems. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015;6:1-19.
- Tsai S-M, Liu H-J, Shien J-H, Lee L-H, Chang P-C, Wang C-Y.** Rapid and sensitive detection of infectious bursal disease virus by reverse transcription loop-mediated

- isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *J Virol Methods*. 2012; 181:117-124.
- Ünal N, Çınar OD.** Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton-Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Trop Anim Health Prod*, 2012; 44: 369-375.
- Van Ness J, Van Ness LK, Galas DJ.** Isothermal reactions for the amplification of oligonucleotides. *P Natl A Sci India B*. 2003; 100:4504-4509.
- Walker GT, Fraiser MS, Schram JL, Little MC, Nadeau JG, Malinowski DP.** Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique. *Nucleic Acids Res.* 1992; 20:1691-1696.
- Walker GT.** Empirical aspects of strand displacement amplification. *Genome Res*, 1993; 3: 1-6.
- Walker GT, Nadeau JG, Spears PA, Schram JL, Nycz CM, Shank DD.** Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from *Mycobacterium tuberculosis* and other mycobacteria. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22:2670-2677.
- Wang F, Jiang L, Yang Q, Prinyawiwatkul W, Ge B.** Rapid and specific detection of *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, O145, and O157 in ground beef, beef trim, and produce by loop-mediated isothermal amplification. *Appl Environ Microbiol*. 2012; 78:2727-2736.
- Won JY, Min J.** Highly sensitive *Escherichia coli* O157: H7 detection in a large volume sample using a conical polymer tube chamber consisting of micro-glass beads. *Biosens Bioelectron*, 2010; 26:112-117.
- Won JY, Min J, Park J-H.** Bacteria adsorption on hydrophilic surfaces for the sensitive detection of pathogenic bacteria using a single tube chamber system. *Biosens Bioelectron*. 2010; 26:1763-1767.
- Xie Q-M, Ji J, Pickens TT, Du L-Q, Cao Y-C, Li H-M, Wang L-G, Ma J-Y, Bi Y-Z.** Rapid detection of infectious laryngotracheitis virus isolates by loop-mediated isothermal amplification. *J Virol Methods*. 2010; 165:71-75.
- Zhang F, Bao S, Yu S, Cheng J, Tan L, Qiu X, Song C, Dai Y, Fei R, Ding C.** Development of a loop-mediated isothermal amplification targeting a gene within the pyruvate dehydrogenase complex, the *pdhA* gene, for rapid detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *J Vet Diagn Invest*. 2015; 27:260-267.
- Zhang G, Brown EW, González-Escalona N.** Comparison of real-time PCR, reverse transcriptase real-time PCR, loop-mediated isothermal amplification, and the FDA conventional microbiological method for the detection of *Salmonella* spp. in produce. *Appl Environ Microbiol*. 2011; 77:6495-6501.
- Zhao W, Brook MA, Li Y.** (2008) Periodic Assembly of Nanospecies on Repetitive DNA Sequences Generated on Gold Nanoparticles by Rolling Circle Amplification Nanostructure Design: Methods and Protocols. Eds: Gazit E, Nussinov R. Totowa, NJ Humana Press, p: 79-90.
- Zhao Y, Chen F, Li Q, Wang L, Fan C.** Isothermal amplification of nucleic acids. *Chemical Rev*. 2015; 115:12491-12545.

## Granzimlerin Apoptotik ve Non-Apoptotik Etkileri

Ercan KESKİN<sup>1</sup>, Durmuş HATİPOĞLU<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Selcuk University Faculty of Veterinary Medicine Physiology Department Konya / TURKEY

\*Corresponding author e-mail: drhatip@selcuk.edu.tr

### ÖZ

Granzimler (granül enzimler), değişime uğramış hücreler ve virüs enfeksiyonlarından memelileri korumak için hedef hücreler içerisine sitotoksik lenfositlerin granüllerinden salınan proteazlardır. Hedef hücre sitoplazmalarının içerisine salınan granzimler bu hücrelerin ölümünü gerçekleştirmek amacıyla bazı spesifik yolları harekete geçirirler. Hedef hücrenin ölümünün gerçekleştirilmesi bu proteazların esas fonksiyonları olarak değerlendirilse de elde edilen bulgular hücre ölümü dışında başka fonksiyonlara da sahip olduklarını göstermektedir. Granzimler, virusların konakçıda hayat sikluslarını devam ettirebilmeleri için kodladıkları proteinleri parçalamak suretiyle doğrudan antiviral aktivite de gösterebilmektedirler. Çeşitli yangısal süreçlerde dolaşımdaki granzimlerin seviyelerinin artması ve ekstraselüler substratların granzimlerce parçalanması bu proteazların kronik inflamatuvar hastalıkların patogenezi, tümör hücrelerinin rejeksiyonu ve viral enfeksiyonlarla ilgili ekstraselüler etkilere sahip olabileceğini de göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Granzim, Granzim A, Granzim B, Perforin, Apoptozis

### Apoptotic and Non-Apoptotic Effects of Granzyme

#### ABSTRACT

Granzymes (granule enzymes) are proteases that are released from the granules of cytotoxic lymphocytes into target cells to protect mammals from altered cells and virus infections. Granzymes released into the target cell cytoplasm activate some specific pathways to effect the death of these cells. Although the realization of death of the target cell is regarded as the main function of these proteases, the findings show that they have other functions besides cell death. Granzymes can display antiviral activity directly by breaking down the proteins they encode so that the virus can survive life cycles in the host. The increased levels of circulating granzymes and disintegration of extracellular substrates into granules in various inflammatory processes indicate that these proteases may have extracellular effects on pathogenesis of chronic inflammatory diseases, rejection of tumor cells and viral infections.

**Key Words:** Granzyme, Granzyme A, Granzyme B, Perforin, Apoptosis



## GİRİŞ

Granzimler (granül enzimler), değişime uğramış hücreler ve virüs enfeksiyonlarından memelileri korumak için hedef hücreler içerisine sitotoksik lenfositlerin granüllerinden salınan proteazlardır. Hedef hücre sitoplazmalarının içerisine salınan granzimler bu hücrelerin ölümünü gerçekleştirmek amacıyla bazı özel yolları harekete geçirirler. Hedef hücrenin ölümünün gerçekleştirilmesi bu proteazların esas fonksiyonları olarak değerlendirilse de elde edilen bulgular hücre ölümü dışında başka fonksiyonlara da sahip olduklarını göstermektedir. Granzimler, virusların konakçıda hayat sikluslarını devam ettirebilmeleri için kodladıkları proteinleri parçalamak suretiyle doğrudan antiviral etkinlik gösterebilmektedirler. Çeşitli yangısal süreçlerde dolaşımdaki granzimlerin seviyelerinin artması ve ekstraselüler substratların granzimlerce parçalanması bu proteazların kronik inflamatuvar hastalıkların patojenezisi, tümör hücrelerinin rejeksiyonu ve viral enfeksiyonlarla ilgili ekstraselüler etkilere sahip olabileceğini göstermektedir (Romero ve Andrade 2008).

Granzimler büyük çoğunlukla sitotoksik lenfositler tarafından ekspre edilen serin proteaz subfamilyasına ait enzimlerdir. Granzim (Gzm) A ve B tanımlanan ve klonlanan ilk enzimlerdir. Granzimlerin ilk olarak hücrel sitotoksikite ile ilgili rolleri bilinmesine rağmen, hedef hücre ölümüne dair fonksiyonlarının tanımlanması daha sonraları olmuştur (Romero ve Andrade 2008). Granzimler için ilk moleküler hedeflerin ekstraselüler matriks proteinleri olduğu bulunmakla birlikte, granzimlerin T lenfositlerin ekstraselüler matriks proteinlerine yapışmasını önlediği bildirilmektedir (Sayers ve ark., 1992). Bununla birlikte, gzmB'nin efektör kaspazların aktivasyonu ve direk parçalanması yoluyla hedef hücre apoptozunu indükleyebileceği bildirimler arasındadır (Darmon ve ark., 1996). Bu nedenle son yıllardaki çalışmalar granzimlerin hedef hücre ölümünü nasıl indükledikleri ve bu enzimlerin antitümör ve antipatojen etkilerinin altında yatan mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (Andrade ve ark., 2004, Kelly ve ark., 2004).

Granzimler sitotoksik hücrelerden bir kez salındığında ekstraselüler ve hedef hücre içerisinde olmak üzere konakçının farklı iki kompartmanında bulunabilmektedirler (Romero ve Andrade 2008). İki senaryoda da GzmB diğer enzimler gibi kaspazlar, BH3-interacting domain death agonist (Bid) ve Inhibitor of Caspase Activated DNase (ICAD) ile tümör yaşamıyla ilgili yüzey reseptörleri

(Loeb ve ark., 2006) ve ekstraselüler matriks proteinlerinin parçalanması dahil farklı ölüm efektör yollarını kullanarak hedef hücre ölümünü indükleyebilmektedir (Andrade ve ark., 2004).

Granzimlerin hedef hücre ölümünün indüksiyonuna dair rollerine ilave olarak diğer önemli fonksiyonlara da sahip olduğuna dair bulgular söz konusudur (Buzza ve Bird 2006). Son yıllardaki çalışmalar insan, fare ve rat GzmB'lerinin fonksiyonel ve yapısal olarak farklı olduğunu göstermiştir (Andrade ve ark., 2003, Kaiserman ve ark., 2006, Casciola-Rosen ve ark., 2007).

### Granzimler

Granzimler katalitik alanda korunan üçlü ana yapıya (His57, Asp102 ve Ser195) sahip kemotripsin ile yakından ilişkili bir serin proteaz subfamilyasıdır. İnsan sitotoksik lenfositleri substrat spesifikliğı açısından farklı beş granzim içerir. Her ne kadar ilk tanımlanan GzmA olmasına rağmen GzmB'den daha az bilgi mevcuttur. GzmA, apoptozdan morfolojik olarak farklı olmayan kaspazdan bağımsız hücre ölümünü indükleyen bir triptazdır (Beresford ve ark., 1999, Shresta ve ark., 1999). GzmA, ECM proteinlerinden kollajen, fibronektin ve bazal membran proteoglikanları da dahil birçok substratı parçalama özelliğine sahiptir. Hedef hücre ölümüne ilaveten GzmA dokular arasında sitotoksik lenfositlerin migrasyonu veya damar dışına çıkmalarında rol oynamaktadır (Buzza ve Bird 2006). GzmA'nın fibrin pıhtıları yoluyla sitotoksik lenfositlerin migrasyonunu kolaylaştırdığı ve pro-ürokinazı aktive etme özelliğine sahip olduğu bildirilmektedir (Brunner ve ark., 1990). Bununla ilgili olarak GzmA'nın sinir hücreleri üzerinde bulunan trombin reseptörünü parçalayarak akson ve astrositlerde morfolojik değişikliklere yol açtığı gözlemlenmiştir (Suidan ve ark., 1996). Ayrıca GzmA ekstraselüler olarak monosit, fibroblast ve epitel hücreleri tarafından sitokin üretiminin indüksiyonu gibi diğer biyolojik tepkileri düzenleyebilmektedir. GzmB, serin proteazlar arasında özgün bir yapıya sahip olup, kaspazlar gibi aspartik asit uzantılarını parçalamaktadır (Lord ve ark., 2003, Trapani ve Sutton 2003). Kaspazları, özellikle hücre ölümünde kilit rol oynayan kaspaz-3'ü aktive ederek hedef hücre apoptozunu indükleyen bir proteazdır (Darmon ve ark., 1995, Adrain ve ark., 2005). İnsan GzmB'si kaspaz substratlarını, Bid'i ve ICAD'ı parçalamak suretiyle kaspazlar ile aynı mitokondriyal ve DNA yıkım yollarını aktive ederek hücre ölümünü indükler (Casciola-Rosen ve ark., 2007). Birbiri ile yakından ilişkili olan GzmB ve H'yi kodlayan genler insan kromozom 14q11.2 bölgesinde toplanmıştır. GzmB aspartik asitten sonraki spesifik zinciri parçalarken, GzmH hidrofobik, aromatik aminoasit kalıntılarından sonra parçalanmadan sorumlu kemotripsin benzeri tiyoester aktivitesine sahiptir. GzmB'nin hücre dışı substratları parçalaması ile

ilgili yapılan çalışmalarda GzmA gibi ECM proteoglikanlarını parçalayabildiği gösterilmiştir (Sayers ve ark., 1992). GzmB kondrositler tarafından sentezlenen proteoglikanlar ile özellikle kıkırdakta bol olarak bulunan ve bir proteoglikan olan aggrecanı da parçalamaktadır (Froelich ve ark., 1993, Runday ve ark., 2001). GzmB'nin aggrecan, fibronektin ve laminin'deki bölünme bölgeleri henüz tanımlanmamakla birlikte, vitronektin için primer bölünme bölgesinin Arg-Gly-Aspx (RGD) integrin bağlama bölgesi olduğu tespit edilmiştir (Buzza ve ark., 2005). Bu da GzmB'nin aspartaz aktivitesi ile tutarlıdır (Buzza ve Bird 2006). Fare GzmC'sinin ve insan GzmH'sinin homolog granzimler olduğu, kimotriptik aktiviteye sahip olduğu ve aromatik artıklardan sonra substratları parçaladığı belirtilmektedir. Bu granzimlerin her ikisi de programlanmış hücre ölümü-reaktif oksijen türleri üretimi, mitokondriyal membran potansiyeli dağılımı, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma özellikleriyle kaspazdan bağımsız hücre ölümüne neden olabildikleri öne sürülmektedir. GzmC ve GzmH'nin farklı mitokondriyal yollar kullanabileceği ifade edilmektedir; GzmC'nin sitokrom c salınımını tetiklediği, GzmH'nin ise sitokrom c salınımına neden olmadığı bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2003, Fellows ve ark., 2007). İnsan kromozomu 5q11-12 bölgesinde lokalize olmuş bir gen tarafından kodlanan GzmA ve K tripsin benzeri etkinliğe sahiptir. Fare, sıçan ve insanlarda bulunan ve Gzm3 olarak da bilinen GzmK, GzmA'nın kodlandığı yerlere yakın genlerde kodlanan bir triptazdır (Chowdhury ve Lieberman 2008). GzmK, GzmA'ya benzer olarak mitokondriyal disfonksiyon ile karakterize ve kaspazdan bağımsız hücre ölümünü etkin bir şekilde indükleyebilmektedir. Bununla birlikte, GzmA'dan farklı olarak önceden aşırı B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ekspresyonuna maruz kalan hücrelerde sıçan GzmK'si tarafından indüklenen hücre ölümünün inhibe edildiği bildirilmiştir (MacDonald ve ark., 1999). GzmM'nin öncelikle doğuştan gelen bağışıklıkta işlev gördüğü öne sürülmektedir (Sayers ve ark., 2001).

Farelerde 10 granzim, ratlarda 7 granzim tanımlanmıştır. Fare granzim C-G'sinin insan granzimlerinden farklı olduğu bilinmektedir ve GzmH insana spesifik olarak görülmektedir (Fellows ve ark., 2007). Beş insan granziminin parçalama özellikleri bu proteazların her biri için farklıdır ve hücre ölümünü gerçekleştirmek için farklı efektör yolları kullanmaları muhtemeldir (Andrade ve ark., 2004, Kelly ve ark., 2004, Martinvalet ve ark., 2005, Lu ve ark., 2006, Fellows ve ark., 2007, Zhao ve ark., 2007, Hou ve ark., 2008). Bu granzimler farklı parçalama spesifiklerine sahip olmakla birlikte ekspre edildikleri sitotoksik hücre popülasyonları da farklıdır. GzmH ve M, yüksek oranda doğal katil hücrelerinde (NK) ekspre

edilirken, GzmM istirahat halindeki ve aktive olmuş CD4 ve CD8 hücrelerde ya düşük seviyelerde ekspre edilmekte ya da belirlenemeyecek düzeyde bulunmaktadır (Sedelies ve ark., 2004). Bunun aksine GzmB ve K, NK hücrelerde ekspre edilmezken, GzmB uyarılmış CD4 ve CD8 hücrelerde çok düşük seviyelerden yüksek seviyelere kadar bulunmaktadır. GzmK ise CD3+, CD8+ hücreler, NK T hücreler, T hücreler ve CD56'nın küçük bir alt grubu dahil T hücre hattının lenfosit subpopülasyonunda ekspre edilmektedir. Sonuçta, karışık bir dağılım gösteren GzmA ise istirahat halindeki NK hücreler ile CD4 ve CD8 fenotipleri olmak üzere uyarılmış T hücrelerinde de belirlenebilmektedir (Bade ve ark., 2005). Neden memeliler farklı sitotoksik hücre tiplerinde dağılmış bu kadar geniş proteolitik etkilere sahip granzim çeşitlerine gereksinim duymaktadırlar? Bunların hücrel ekspresyonlarına dayanarak GzmH ve M'nin muhtemelen immun yanıtın başlangıcında rol oynayabilecekleri, GzmB'nin ise adaptif immun sitotoksiste için daha spesifik olduğu söylenebilir. GzmA aksine hem başlangıç hem de adaptif immun yanıt açısından geniş etkinliğe sahipken, GzmK diğer enzimlerle kombine olarak muhtemelen spesifik T lenfosit subpopülasyonlarında önemli görevlere sahiptir. Bu bağlamda bütün insan granzimleri hedef hücre ölümünü indükleyebilmelerine rağmen, farklı hücrelerde ekspresyonları bu granzimlerin ilave spesifik aktivitelere sahip olabileceğini göstermektedir (Andrade ve ark., 2004, Kelly ve ark., 2004, Martinvalet ve ark., 2005). Granzimlerin bu etkileri doğrudan bu enzimleri kodlayan hücrelerin spesifik fonksiyonlarına bağlıdır. Bu nedenle granzimlerin hücrelere spesifik fonksiyonları bütün granzimlerin tek bir efektör hücre tipi tarafından ekspre edilmediği ve farklı olarak düzenlendikleri ile açıklanabilir. Farklı hücre popülasyonları tarafından farklı parçalama özellikleri ve özgünlüğü ile birden fazla granzimin mevcudiyeti tümöral oluşum ve viral enfeksiyonlara karşı savunmada konakçıya sinerjik fonksiyon yapma imkanı sağlar (Romero ve Andrade 2008).

### **Granzimlerin Apoptotik Fonksiyonları**

Hedef hücrelerin tanınmasına yönelik olarak sitotoksik efektör hücreler, membran delici protein olan perforin ve granzimleri içeren sitotoksik granülleri salırlar. Perforin granzimlerin hedef hücreye kendilerinin ya da sinyallerinin girişine ve granzimlerin öldürücü hamlelerini yapmalarına imkan sağlar. Granzimlerce indüklenen ölüm süreci substrat parçalanmasına dayalı iki büyük proteolitik unsura sahiptir. Birincisi, esas olarak hedef hücrenin ölümü ile ilgili sınırlı sayıda intraselüler molekülün parçalanmasına bağlıdır. Bu grup moleküller hedef hücrenin apoptotik olarak öldürülmesinin farklı seviyelerini idare eden ve GzmB tarafından parçalanmış kaspaz, Bid ve ICAD

gibi molekülleri içerir (Lu ve ark., 2006, Zhao ve ark., 2007, Hou ve ark., 2008, Romero ve Andrade 2008). Bu bağlamda granzimler (GzmM hariç) tarafından kullanılan ilk adım mitokondriyal hasar olarak görülmektedir (Kelly ve ark., 2004). Bununla birlikte, GzmB ve muhtemelen GzmK tarafından Bid'in parçalanması yanında (Zhao ve ark., 2007, Romero ve Andrade 2008) GzmA ve H aracılı ölüm esnasında mitokondriyal yıkım için sinyal geçişini sağlayan ölüm efektör substratları tartışmalı olup tanımlanmayı beklemektedir (Fellows ve ark., 2007, Hou ve ark., 2008). İkincisi ise hücre siklusu, hücre tamiri ve protein sentezinde esas olan geniş bir intraselüler protein grubunun direk parçalanması ve inaktivasyonunu kapsar. Bu substratlar arasında GzmB ve A tarafından parçalananlar en iyi şekilde belirlenmişlerdir (Pasternack ve ark., 1991, Casciola-Rosen ve ark., 1999, Martinvalet ve ark., 2005, Loeb ve ark., 2006, Zhu ve ark., 2006, Hostetter ve ark., 2007). İlginç olarak, granzimlerin ölüm efektör moleküllerini parçalamalarına ilişkin mantıklı olarak tanımlanması yanında, ölüm harici efektör substratların parçalanması ve tanınmasının hangi fonksiyona yönelik olup olmadığı da tam olarak açıklanamamış değildir. Granzimler özgün ve farklı parçalama spesifitelerine sahip olmasına rağmen, granzimlerin bazı ortak özellik taşıyan molekül gruplarına sahip substratları tanımları ve aynı substratları parçalayabilmeleri de önemlidir (Romero ve Andrade 2008).

Bu gerçeklerle granzimler hücre ölümü sürecinde intraselüler patojenlerin yaşamları için gerekli esansiyel proteinleri tanıma ve parçalama kabiliyetine sahiptirler. İlginç olarak, granzimler intraselüler patojenlerin ortadan kaldırılması için kritik proteazlar olarak değerlendirilmekle birlikte bu enzimlerin öldürme aktivitelerinin patojenler tarafından doğal olarak enfekte olmayan hücrelerde de görülmesi önemlidir. Ayrıca, virüsler granzimler tarafından aktive edilen intraselüler ölüm yollarını çeşitli mekanizmalarla bloke edebildikleri için (Boya ve ark., 2004, Andrade ve ark., 2007, Romero ve Andrade 2008), hedef hücre ölümlerinin sadece granzimler tarafından kullanılan mekanizmalar ya da intraselüler patojenlerin çoğalmasının sınırlayan ilave non-apoptotik fonksiyonlarca gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği belli değildir (Romero ve Andrade 2008).

### **Granzimlerin Non-apoptotik Fonksiyonları**

İnsan adenovirüs tip 5 (Ad5) ve sitotoksik lenfositlerle ilgili yapılan çalışmalar virüsler ile granzimler arasındaki sıkı ilişkiler olduğunu ortaya koymuştur. Ad5 konakçı immün sistemi ve inflamatuvar cevapları kontrol etmeye yönelik birçok farklı mekanizma geliştirebilen bir patojen olup, genomunun yaklaşık üçte birini bu amaç için kullanabilmektedir (Romero ve Andrade 2008). Bu

virüs, CD81 sitotoksik lenfositler tarafından enfekte olmuş hücrelerin tanınmasını engelleyen ürünlerin yanı sıra interferonlar tarafından indüklenen antiviral yolakları bloke eden ve mitokondriyal ölüm reseptörleri ve p53 de dahil olmak üzere çoklu seviyelerde apoptozu indükleyen birçok inhibitörü kodlarken (Andrade ve ark., 2007), belirli bir GzmB inhibitörünü de kodlayabilmektedir (Andrade ve ark., 2001). Adenovirüsün (ve diğer birçok virüsün) enfekte olmuş hücredeki apoptotik yolakları kontrol ettiği göz önüne alındığında, muhtemelen sitotoksik hücreler tarafından indüklenen diğer antiviral mekanizmaların sınırlandırılmasında da önemli roller oynayabileceği düşünülmektedir. Örnek olarak Ad5 ile enfekte olmuş hedef hücrelerin sitotoksik hücreler tarafından öldürülmesi sırasında, gzmH'nin adenovirüs DBP'yi (viral DNA replikasyonu için mutlaka gerekli olan viral bir bileşen) doğrudan parçalayarak enfekte hedef hücredeki virüslerin bozulmasına neden olduğu ileri sürülmüştür (Romero ve Andrade 2008).

### **Ekstraselüler Non-apoptotik Granzim Substratları**

GzmA, B ve K normal sağlıklı bireylerin plazmalarında düşük düzeylerde tespit edilmiştir. Sitotoksik hücre aracılı immün yanıtı açığa çıkaran çeşitli süreçlerde miktarları artmaktadır (Buzza ve Bird 2006). Bu bulgular hedef hücrenin tanınmasına kadar sitotoksik hücrelerden hem intraselüler hem de ekstraselüler olarak salındıklarını göstermektedir (Romero ve Andrade 2008). Bu bulgular ekstraselüler alanlarda granzimlerin rol oynadığı patolojik ve fizyolojik zinciri belirlemeye yönelik çalışmaları hızlandırmıştır. Bu fizyolojik zincir; lenfosit migrasyonunun arttırılması, tümör hücre migrasyonunun, hücre aktivasyonu ile sitokin üretiminin inhibisyonu, tümörün yaşaması ve muhtemel antiviral aktivitelerle ilgili yüzey reseptörlerinin parçalanması ya da hücrelerden ayrılması vasıtasıyla hücre ölümünün indüksiyonunu kapsamaktadır (Buzza ve Bird 2006). Virüslerin hücreyi enfekte edebilmeleriyle ilgili viral ya da konakçı yüzey proteinlerini parçalayıp parçalamadıkları ya da inaktive edip edemedikleri konusu hala açıklanması gereken noktalardan birisidir. Ekstraselüler granzimler, çölyak hastalığı, hipersensitiv pnömonitis, kronik alerjik astım ve artritis gibi otoimmün hastalıklar ya da kronik alerjik hastalıklarda olduğu gibi vasküler hastalıklarda da yangısal doku hasarı ile ilgili olabilirler (Buzza ve Bird 2006, Mulligan-Kehoe ve ark., 2007). (Tablo 1)

### **Non-sitotoksik hücreler tarafından granzim ekspresyonu**

Granzimlerin ekspresyonu genellikle sitotoksik lenfositlerle sınırlı olmasına rağmen, yapılan çalışmalar GzmB'nin non-sitotoksik hücreler

tarafından daha yoğun olarak ekspre edildiğini gösterdi (Romero ve Andrade 2008). Ayrıca perforin yokluğunda plazmasitoid dentritik hücreler tarafından da GzmB ekspre edilmektedir (Buzza ve Bird 2006). İlginç olarak, doğal katil hücre özelliklerine sahip olabilmeleri için gerekli olan interferon- $\alpha$  ile monositlerden türeyen dentritik hücreler aynı zamanda GzmB ekspre ederler (Korthals ve ark., 2007). Bununla birlikte plasental trofoblastlarda ve gelişmekte olan spermatozoid benzeri reproduktif sistem hücrelerinde GzmB ekspresyonu tanımlanmıştır (Buzza ve Bird 2006). İlave olarak, primer insan meme kanseri, normal artiküler kondrositler ve romatoid artritli hastalardaki kondrositlerde artan

konsantrasyonlarda GzmB tespit edilmiştir (Horiuchi ve ark., 2003, Buzza ve Bird 2006). Son zamanlardaki çalışmalarda ultraviyole B ve ultraviyole A ışınlarından sonra keratinositlerde, mast hücrelerinde ve bazofillerde GzmB'nin varlığı belirlenmiştir (Tschopp ve ark., 2006, Hernandez-Pigeon ve ark., 2007, Strik ve ark., 2007). Ultraviyole B ışınlarına maruz kalan keratinositler ve artiküler kondrositler hariç nonsitotoksik hücreler tarafından GzmB ile birlikte perforinin ekspre edilmemesi bu hücrelerden salınan GzmB'nin daha çok ekstraselüler aktivitelere sahip olduğunu akla getirmektedir (Romero ve Andrade 2008). (Tablo 2)

**Tablo 1:** Granzim A ve B'nin ekstraselüler substratları ve fonksiyonları (Buzza ve Bird 2006, Loeb ve ark., 2006, Mulligan-Kehoe ve ark., 2007)

**Table 1:** Extracellular substrates of human gzmA and gzmB (Buzza ve Bird 2006, Loeb ve ark., 2006, Mulligan-Kehoe ve ark., 2007)

<b>Granzim</b>	<b>Fonksiyon</b>
<b>1.Gzm B</b>	
• <b>Agrekan</b>	Romatoid artritte eklem yıkımına katkıda bulunabilir
• <b>Vibronektin,Fibronektin,Laminin</b>	Hücre dışı matris remodeling aktivitesi. Endotel hücrelerinin anoiks indüksiyonu. Tümör hücresi yayılımı, migrasyon ve istilanın önlenmesi. Muhtemelen lenfosit göçü. Virüs bulaşıcılığının sınırlandırılması.
• <b>NOTCH1/FGFR1</b>	Tümör sağkalımı ile ilgili yüzey reseptörlerinin bölünmesiyle hücre ölümü
• <b>Plazminojen</b>	Sklerodermada gözlenen bazı vasküler defektlerden sorumlu tutulabilir.
<b>2. Gzm A</b>	
• <b>Pro-ürokinaz plazminojen aktivatörü</b>	Fibrin pıhtıları aracılığıyla lenfosit göçü.
• <b>Hücre yüzey reseptörü</b>	Fibroblast ve epitel hücreleri tarafından monosit aktivasyonu ve sitokin üretimi

(FGFR1, Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1; Gzm, granzim)

**Tablo 2:** Non-sitotoksik hücreler tarafından GrzB'nin ekspresyonu. (Horiuchi ve ark., 2003, Buzza ve Bird 2006, Tschopp ve ark., 2006,).

**Table 2:** Expression of gzmB by non-cytotoxic cells (Horiuchi ve ark., 2003, Buzza ve Bird 2006, Tschopp ve ark., 2006,).

<b>Granzim</b>	<b>Fonksiyon</b>
• <b>Bazofil</b>	Alerjik yangı mediatörü
• <b>Mast hücreleri</b>	Hücre ölümü, vasküler geçirgenliğin artması Lökosit ekstrasvazasyonu
• <b>Keratinositler</b>	Sitotoksikite ve hücre ayrılmasının indüksiyonu
• <b>Plasental trofoblastlar</b>	Gelişmekte olan germ hücrelerinin migrasyonunu kolaylaştırmak için hücre dışı matris bileşenlerin hidroliz edilmesi ve doğum sırasında plasentada hücre dışı matriksin yeniden modellenmesi
• <b>Eklem kıkırdağının kondrositleri</b>	Ekstraselüler matriksin yeniden modellenmesi
• <b>Monosit türevi dentrik hücreler</b>	Sitotoksikite

## SONUÇ

Transforme ve enfekte hücrelerin etkin bir şekilde sitotoksik lenfositler tarafından temizlenmesi, konakçının antipatojen ve antitümör aktivitesini bloke edebilen tümör inhibitörleri ve patojenleri bypass edebilme kabiliyetine bağlıdır. Patojenler ve tümörler çeşitli inhibitör mekanizmalarla apoptozisi bloke edebildikleri için, sitotoksik hücrelerin virüs ve tümör yayılmasını sınırlandırmaya yönelik apoptozisten bağımsız olarak kullandıkları yolların varlığı katil hücrelerin antipatojenik ve antitümör fonksiyonlarını destekleyici olarak görülebilir.

## KAYNAKLAR

- Adrain C, Murphy BM, Martin SJ.** Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. 2005; *Journal of Biological Chemistry*, 280, 6, 4663-4673.
- Andrade F, Bull HG, Thornberry NA, Ketner GW, Casciola-Rosen LA, Rosen A.** Adenovirus L4-100K assembly protein is a granzyme B substrate that potently inhibits granzyme B-mediated cell death. 2001; *Immunity*, 14, 6, 751-761.
- Andrade F, Casciola-Rosen LA, Rosen A.** Granzyme B-induced cell death. 2004; *Acta haematologica*, 111, 1-2, 28-41.
- Andrade F, Casciola-Rosen LA, Rosen A.** A novel domain in adenovirus L4-100K is required for stable binding and efficient inhibition of human granzyme B: possible interaction with a species-specific exosite. 2003; *Molecular and cellular biology*, 23, 17, 6315-6326.
- Andrade F, Fellows E, Jenne DE, Rosen A, Young C.** Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition. 2007; *The EMBO Journal*, 26, 8, 2148-2157.
- Bade B, Boettcher HE, Lohrmann J, Hink-Schauer C, Bratke K, Jenne DE, Virchow Jr JC, Luttmann W.** Differential expression of the granzymes A, K and M and perforin in human peripheral blood lymphocytes. 2005; *International immunology*, 17, 11, 1419-1428.
- Beresford PJ, Xia Z, Greenberg AH, Lieberman J.** Granzyme A loading induces rapid cytolysis and a novel form of DNA damage independently of caspase activation. 1999; *Immunity*, 10, 5, 585-595.
- Boya P, Pauleau A-L, Poncet D, Gonzalez-Polo R-A, Zamzami N, Kroemer G.** Viral proteins targeting mitochondria: controlling cell death. 2004; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1659, 2, 178-189.
- Brunner G, Simon MM, Kramer MD.** Activation of pro-urokinase by the human T cell-associated serine proteinase HuTSP-1. 1990; *FEBS letters*, 260, 1, 141-144.
- Buzza MS, Bird PI.** Extracellular granzymes: current perspectives. 2006; *Biological chemistry*, 387, 7, 827-837.
- Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, Froelich CJ, Nice EC, Bird PI.** Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. 2005; *Journal of Biological Chemistry*, 280, 25, 23549-23558.
- Casciola-Rosen L, Andrade F, Ulanet D, Wong WB, Rosen A.** Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status. 1999; *Journal of Experimental Medicine*, 190, 6, 815-826.
- Casciola-Rosen L, Garcia-Calvo M, Bull HG, Becker JW, Hines T, Thornberry NA, Rosen A.** Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. 2007; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 7, 4545-4552.
- Chowdhury D, Lieberman J.** Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. 2008; *Annual review of immunology*, 26, 389.
- Darmon AJ, Ley TJ, Nicholson DW, Bleackley RC.** Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. 1996; *Journal of Biological Chemistry*, 271, 36, 21709-21712.
- Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC.** Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. 1995; *Nature*, 377, 6548, 446-448.
- Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC.** Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. 2007; *Blood*, 110, 2, 544-552.
- Froelich CJ, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WL.** Human

- granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. 1993; *The journal of immunology*, 151, 12, 7161-7171.
- Hernandez-Pigeon H, Jean C, Charruyer A, Haure M-J, Baudouin C, Charveron M, Quillet-Mary A, Laurent G.** UVA Induces Granzyme B in Human Keratinocytes through MIF IMPLICATION IN EXTRACELLULAR MATRIX REMODELING. 2007; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 11, 8157-8164.
- Horiuchi K, Saito S, Sasaki R, Tomatsu T, Toyama Y.** Expression of granzyme B in human articular chondrocytes. 2003; *The Journal of rheumatology*, 30, 8, 1799-1810.
- Hostetter DR, Loeb CR, Chu F, Craik CS.** Hip is a pro-survival substrate of granzyme B. 2007; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 38, 27865-27874.
- Hou Q, Zhao T, Zhang H, Lu H, Zhang Q, Sun L, Fan Z.** Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage. 2008; *Molecular immunology*, 45, 4, 1044-1055.
- Johnson H, Scorrano L, Korsmeyer SJ, Ley TJ.** Cell death induced by granzyme C. 2003; *Blood*, 101, 8, 3093-3101.
- Kaiserman D, Bird CH, Sun J, Matthews A, Ung K, Whisstock JC, Thompson PE, Trapani JA, Bird PI.** The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. 2006; *J Cell Biol*, 175, 4, 619-630.
- Kelly JM, Waterhouse NJ, Cretney E, Browne KA, Ellis S, Trapani JA, Smyth MJ.** Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death. 2004; *Journal of Biological Chemistry*, 279, 21, 22236-22242.
- Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, Maihöfer D, Schott M, Papewalis C, Blanco ED, Winter M, Czibere A, Haas R.** Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- $\alpha$  acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. 2007; *Journal of translational medicine*, 5, 1, 46.
- Loeb CR, Harris JL, Craik CS.** Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. 2006; *Journal of Biological Chemistry*, 281, 38, 28326-28335.
- Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC.** Granzyme B: a natural born killer. 2003; *Immunological reviews*, 193, 1, 31-38.
- Lu H, Hou Q, Zhao T, Zhang H, Zhang Q, Wu L, Fan Z.** Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. 2006; *The Journal of Immunology*, 177, 2, 1171-1178.
- MacDonald G, Shi L, Velde CV, Lieberman J, Greenberg AH.** Mitochondria-dependent and-independent regulation of granzyme B-induced apoptosis. 1999; *The Journal of experimental medicine*, 189, 1, 131-144.
- Martinvalet D, Zhu P, Lieberman J.** Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis. 2005; *Immunity*, 22, 3, 355-370.
- Mulligan-Kehoe MJ, Drinane MC, Mollmark J, Casciola-Rosen L, Hummers LK, Hall A, Rosen A, Wigley FM, Simons M.** Antiangiogenic plasma activity in patients with systemic sclerosis. 2007; *Arthritis & Rheumatology*, 56, 10, 3448-3458.
- Pasternack M, Bleier KJ, McInerney TN.** Granzyme A binding to target cell proteins. Granzyme A binds to and cleaves nucleolin in vitro. 1991; *Journal of Biological Chemistry*, 266, 22, 14703-14708.
- Romero V, Andrade F.** Non-apoptotic functions of granzymes. 2008; *HLA*, 71, 5, 409-416.
- Ronday H, Van Der Laan W, Tak P, de Roos J, Bank R, TeKoppele J, Froelich C, Hack C, Hogendoorn P, Breedveld F.** Human granzyme B mediates cartilage proteoglycan degradation and is expressed at the invasive front of the synovium in rheumatoid arthritis. 2001; *Rheumatology*, 40, 1, 55-61.
- Sayers T, Wiltrout T, Sowder R, Munger W, Smyth M, Henderson L.** Purification of a factor from the granules of a rat natural killer cell line (RNK) that reduces tumor cell growth and changes tumor morphology. Molecular identity with a granule serine protease (RNKP-1). 1992; *The Journal of Immunology*, 148, 1, 292-300.
- Sayers TJ, Brooks AD, Ward JM, Hoshino T, Bere WE, Wiegand GW, Kelley JM,**

- Smyth MJ.** The restricted expression of granzyme M in human lymphocytes. 2001; *The Journal of Immunology*, 166, 2, 765-771.
- Sayers TJ, Wiltrout T, Sowder R, Munger W, Smyth M, Henderson L.** Purification of a factor from the granules of a rat natural killer cell line (RNK) that reduces tumor cell growth and changes tumor morphology. Molecular identity with a granule serine protease (RNKP-1). 1992; *The Journal of Immunology*, 148, 1, 292-300.
- Sedelies KA, Sayers TJ, Edwards KM, Chen W, Pellicci DG, Godfrey DI, Trapani JA.** Discordant regulation of granzyme H and granzyme B expression in human lymphocytes. 2004; *Journal of Biological Chemistry*, 279, 25, 26581-26587.
- Shresta S, Graubert TA, Thomas DA, Raptis SZ, Ley TJ.** Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. 1999; *Immunity*, 10, 5, 595-605.
- Simon M, Prester M, Nerz G, Kramer M, Fruth U.** Release of biologically active fragments from human plasma-fibronectin by murine T cell-specific proteinase 1 (TSP-1). 1988; *Biological chemistry Hoppe-Seyler*, 369, 107-112.
- Strik MC, de Koning PJ, Kleijmeer MJ, Bladergroen BA, Wolbink AM, Griffith JM, Wouters D, Fukuoka Y, Schwartz LB, Hack CE.** Human mast cells produce and release the cytotoxic lymphocyte associated protease granzyme B upon activation. 2007; *Molecular immunology*, 44, 14, 3462-3472.
- Suidan HS, Clemetson KJ, Brown-Luedi M, Niclou SP, Clemetson JM, Tschopp J, Monard D.** The serine protease granzyme A does not induce platelet aggregation but inhibits responses triggered by thrombin. 1996; *Biochemical Journal*, 315, 3, 939-945.
- Trapani JA, Sutton VR.** Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. 2003; *Current opinion in immunology*, 15, 5, 533-543.
- Tschopp CM, Spiegl N, Didichenko S, Lutmann W, Julius P, Virchow JC, Hack CE, Dahinden CA.** Granzyme B, a novel mediator of allergic inflammation: its induction and release in blood basophils and human asthma. 2006; *Blood*, 108, 7, 2290-2299.
- Zhao T, Zhang H, Guo Y, Fan Z.** Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death. 2007; *Journal of Biological Chemistry*, 282, 16, 12104-12111.
- Zhu P, Zhang D, Chowdhury D, Martinvalet D, Keefe D, Shi L, Lieberman J.** Granzyme A, which causes single-stranded DNA damage, targets the double-strand break repair protein Ku70. 2006; *EMBO reports*, 7, 4, 431-437.

## Instruction for Authors

Kocatepe Veterinary Journal (KVJ) has the policy with One Medicine One Health. Research article, reviews, brief communication and case reports, letters to editor and book reviews are also welcome for consideration to publish articles of high scientific and ethical standards.

The journal is published four times a year. The publication of the text and figures is **free** of charge.

Acceptance of papers for the KVJ is undertaken by Editors. Editorial Board members adjudicate in the case of conflicting or adverse reports.

Manuscripts are accepted for consideration on the understanding that they are for publication solely in KVJ and that they neither have been published nor are under consideration for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Upon acceptance of the article by the journal, the author(s) will be asked to transfer the copyright of the article to the Publisher.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study. After article is checked by **Professional Plagiarism Prevention** program, article will be sent to authors.

Articles are checked by iThenticate® program, when plagiarism or self-plagiarism are detected, they will not be evaluated for publication.

If animals are used in the studies, study should be approved by an Ethical Committee, Name of Ethical Committee and Approved Number should be mentioned in the Material and Method section. Editor may reject directly the article, if animal is exposed to stressful or painful conditions.

Authors accept ethical rules when article is sent for publication. Author(s) should send Copyright Transfer Agreement, after acceptance of article.

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study.

**Article should be written using Garamond, font of 11 point, with 1.5 line spacing, margins of the A4 paper should be 2.5 cm from all edges (Word97-2010.doc). Abbreviations should be written in SI. Research article submitted to Kocatepe Veterinary Journal should be divided into the following sections:**

**Title page** (Abstract, Key words without authors name and address), **Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusions, References, Tables, Graphics, Figures.**

**Title page:** Papers should be headed with the full title, the initial letters of name and surnames of the authors, the name and address of the institution where the work is carried out. The telephone number, fax number and e-mail address of the corresponding author should also be provided. The title should be short, specific and informative.

**Abstract** Should be no more than 200 words, outlining in a single paragraph.

**Keywords,** 5 keywords that describe the crucial points of the paper should be provided. Keywords should be chosen from Turkey Science Term ([www.bilimterimleri.com](http://www.bilimterimleri.com))

**Introduction,** an updated literature related to paper and aim(s) of the study should be clearly given in this section.

**Materials and methods,** a clear account of materials used and methods employed should be given and it should be applicable/repeatable by other researchers.

**Results,** as concise as possible. Text, tables and figures illustrating the same data should be limited and succinctly outline the pertinent outcomes of the study.

**Discussion:** Results of the study should be discussed with directly relevant references. This section may also be divided into subsections.

**Conclusions:** This section should state clearly the main conclusions of the research. Results should not be repeated.

**Acknowledgements,** it is advised to acknowledge persons or institutions directly or indirectly involved in the study.

### References

References in the text should be made as follows: **Kara (2012)** described. / . was reported (**Zemheri 2015, Eryavuz and Yeni, Eryavuz et al. 2015**). List of references should be given alphabetically in the reference list. Different publications having the same author(s) of same year should be written as **2011a, 2011b**. Web address should be referenced as **anonim** for example **Anonim 2015**. Only official web pages should be used. Author name(s) and date should be written bold. The reference list at the end of the paper should be written as below.



**Journal:**

**Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fidan AF, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *J Trace Elem Med Biol.* 2010; 24(3):161-164.

**Book section:**

**Juneja R, Koide SS.** Molecular Biology of Reproduction, In: *Reproduction in Farm Animals*, Ed; HafezB, Hafez ESE, 7<sup>th</sup> Ed., LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia, USA. 2000; pp. 354-361.

**Web page:**

**Anonymous.** [http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb\\_id=46&cust\\_id=13](http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13);Accessien date: 02.01.2012.

**Thesis:**

**Yeni D.** Some andrological parameters and biochemical properties in relation to season in rams. PhD thesis, Afyon Kocatepe University Health Science Institute, Afyonkarahisar, 2010.

**Tables:** Tables should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Graphics:** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript.

**Figures :** Figures should be presented in a separate page at the end of manuscript. Figures should be 80 or 160 mm, minimum 300 dpi.

**Titles of tables, graphics and figures should be both Turkish and English.**

**Brief Communications:** Brief communications should be concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later publication. They should not exceed 1600 words. They should bear no more than two tables or figures. An ABSTRACT should be given but no other sections. Typescripts should be clearly marked Brief Communication.

**Review Articles:** Review articles related to all medical topics are welcome for publication. They should give an update on recent advances in a particular field and be targeted at research veterinarians or clinicians who are not necessarily working in the same field. The length should not exceed 4500 words. It should have a precise abstract. Author of review should have at least two citations. For each issue maximum 2 reviews are published.

**Case Reports:** Reports of SINGLE or small numbers of cases will be considered for publication in KVJ if the case(s) are particularly unusual/rare or the report contributes materially to the literature. A case report should not exceed 1500 words and must comprise a Summary (maximum 150 words), Introduction, Case History and Discussion. The report should accomplish one of the followings:

- To be a substantially novel presentation
- To be a technique or treatment that would substantially alter management and prognosis of the described condition
- The first clinical report or first case(s) of diseases in a particular location where epidemiology is an important factor
- To exemplify best practice in medical science.

**Letters to The Editor:** Letters describing case reports or original material may be published in the KVJ and will be peer-reviewed prior to publication. Letters making criticisms on recently published papers in the KVJ will also be considered and the corresponding authors of the original paper will be invited to respond accordingly.

**All articles sent to KVJ (Kocatepe Veterinary Journal) ONLINE submission only.**

**During submission documents which are listed below, have to install to the system;**

1. **Title Page:** Author and institution names
2. **Main text:** Author and institution names should NOT be. Tables(s), graphic(s) and figure(s) etc. Should be on the last page of article, also title of them both in Turkish and English.
3. **Article addition:** Table(s), graphic(s) and figure(s) should have been installed to the system separately.
4. **Author Approval Form (Cover Letter):** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.
5. **Copyright:** All authors need to sign it and install to the system. Signatures should be wet signatures and send to the Editorial Board of Kocatepe Veterinary Journal.