



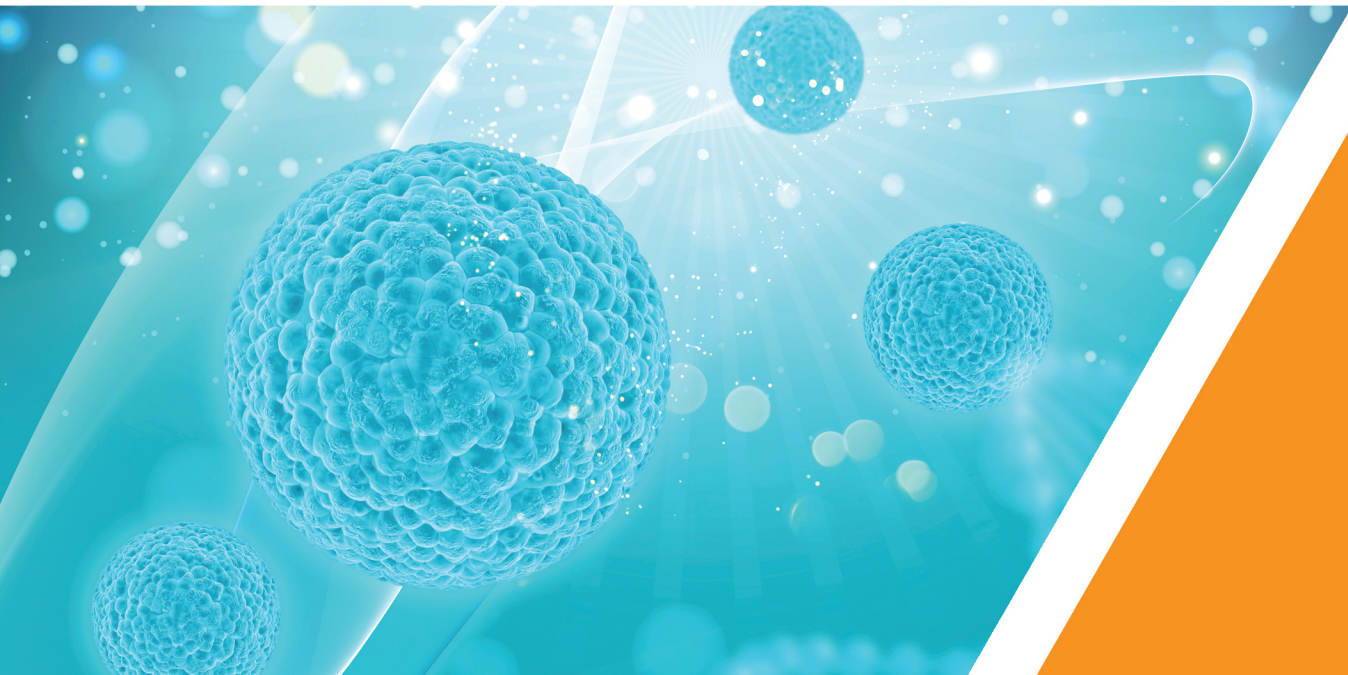
ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ

Veteriner Bilimleri Dergisi

ATATURK UNIVERSITY

Journal of Veterinary Sciences



<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>

Yıl/Year : 2018

Cilt/Volume : 13

Sayı/Issue : 3

ISSN: 1306-6137
e-ISSN: 2147-9615

**Atatürk Üniversitesi
Veteriner Bilimleri Dergisi**

**Atatürk University
Journal of Veterinary Sciences**

<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>

Aralık / December

Yıl/Year: 2018

Cilt/Volume: 13

Sayı/Issue: 3



**ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER BİLİMLERİ DERGİSİ**

ISSN: 1306 – 6137 / e-ISSN: 2147 - 9615

**ATATÜRK UNIVERSITY
JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE**



ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ VETERİNER FAKÜLTESİ ADINA SAHİBİ / OWNER

Prof. Dr. Hamza AVCIOĞLU

YAYIN KURULU / EDITORIAL BOARD

Baş Editör / Editor-in-Chief

Prof. Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ

Editör Yardımcıları / Associate Editors

Doç. Dr. Özgür Kaynar
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Doç. Dr. Elif DOĞAN
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Doç. Dr. Serkan YILDIRIM
(Bölüm Editörü / Section Editor)

Dr. Öğr. Üyesi Serdar ALTUN
(Bölüm Editörü / Section Editor)

YAYIN KURULU ÜYELERİ / EDITORIAL BOARD MEMBERS

Dr. Mustafa Atasever, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Zekai Halıcı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Mustafa Alışarlı, TÜRKİYE / TURKEY

Dr. Aleksandra Gorecka-Bruzda, POLONYA / POLAND

Dr. Ardita Jahja-Hoxha, KOSOVA / KOSOVO

Dr. Daniel Zahner, ALMANYA / GERMANY

Dr. Eva Voslarova, ÇEK CUMHURİYETİ / CZECH REPUBLIC

Dr. Tanvir Rahman, BANGLADEŞ / BANGLADESH

**İngilizce Danışmanı
English Adviser**

Arş. Gör. Çiğdem SEVİM

**Sekreteryaya ve Web Tasarım
Secretariat and Web Design**

Dr. Öğr. Üyesi Serdar ALTUN

**Dizgi
Typesetter**

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL

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

Atatürk University J. Vet. Sci., is a refereed national journal, is published tri-annually in April, October and December. This journal is abstracted in **ELSEVIER-Scopus**, **CAB Abstract**, **CABI full text**, **EBSCO**, **TUBİTAK-ULAKBİM-Life Science Database** and **Türkiye Citation Index**.

Yazışma Adresi / Correspondence Address

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğü, 25240, Kampüs
Erzurum / TÜRKİYE

Tel : +90 442 2317222, Fax: +90 442 2317244

E-posta: atavetderg@atauni.edu.tr; vetdergisi@atauni.edu.tr

Yıl / Year: 2018

Cilt / Volume: 13

Sayı / Issue : 3

Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg., 2018; 13(3)

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

- Prof. Dr. Ali ÇINAR, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Bahri PATIR, Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Bingöl, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Barış SARI, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Ekrem LAÇİN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Ertan ORUÇ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Fatma İNAL, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Fikret ÇELEBİ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Handan VURAL, İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İstanbul, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Hayrunnisa NADAROĞLU, Atatürk Üniversitesi, Erzurum Meslek Yüksekokulu, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. İsmail BAYRAM, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Kübra Asena TERİM KAPAKİN, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Meryem EREN, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mete CİHAN, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kars, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Muhlis MACİT, Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Murat KANBUR, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Mustafa ATASEVER, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Nihat MERT, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Nurcan DÖNMEZ, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Sena ÇENESİZ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Samsun, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Uğur USLU, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Konya, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Yeliz YILDIRIM, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Zafer OKUMUŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Prof. Dr. Zahid Tefik AĞAOĞLU, Cumhuriyet Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Sivas, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Akın KIRBAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Dide KILIÇALP KILINÇ, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Aydın, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Gökhan OTO, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Kanber KARA, Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Kayseri, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Levent ALTINTAŞ, Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Ankara, TÜRKİYE.
- Doç. Dr. Özgür İŞLEYİCİ, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Van, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Cemal ADIGÜZEL, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Nergis ULAŞ, Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Erzurum, TÜRKİYE.
- Dr. Öğr. Üyesi Ulaş ACARÖZ, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Afyonkarahisar, TÜRKİYE.

* Hakem listesi akademik unvan ve isme göre alfabetik olarak sıralanmıştır.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi / Atatürk University Journal of Veterinary Sciences		Sayfa
İÇİNDEKİLER / CONTENTS		Page
Araştırma Makaleleri / Research Articles		
▶ Muhammed KATICA, Indira MUJEZINOVIC, Nedžad GRADASCEVIC. Effects of Noradrenaline on Smooth Musculature of Small and Large Intestines of Fattening Turkey Under In Vitro Conditions (<i>Noradrenalinin İn Vitro Koşullar Altında Besi Hindilerinde İnce ve Kalın Bağırsak Düz Kasları Üzerine Etkisi</i>)	257 - 265	
▶ Necati UTLU, Şaban ÇELEBİ, Menekşe SOYDAN, Esra AKTAŞ ŞENOCAK. The Effects of Dietary Vitamin E and Organic Selenium on the Levels of Some Bioelements in Tissues of Laying Hens (<i>Diyetsel Vitamin E ve Organik Selenyumun Yumurta Tavuğu dokularındaki Bazı Biyoelement Düzeyleri Üzerine Etkileri</i>)	266 - 273	
▶ Özgür Yaşar ÇELİK, Gülşah AKGÜL, Kıvanç İRAK. Investigation of Seroprevalence of Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis in Sheep and Goats in Siirt Province (<i>Siirt İli Koyun ve Keçilerinde Maedi-Visna ve Caprine Arthritis Encephalitis Seroprevalansının Araştırılması</i>)	274 - 277	
▶ Vural DENİZHAN, Kamile BİÇEK. Van İli ve Bazı İlçelerinde Koyunlarda <i>Fasciola hepatica</i> 'nın Seroprevalansı (<i>Seroprevalence of Fasciola hepatica in Sheep in the Province of Van and Some Districts</i>)	278 - 284	
▶ Ahmet GEÇER, Nurhan ERTAŞ ONMAZ. Kanatlı Kesimi Aşamalarında E. Coli O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi (<i>Investigation of Escherichia coli O157:H7 By IMS-PCR Techniques in Poultry Slaughtering Stages</i>)	285 - 292	
▶ Sarper ÖZBEK, Adnan ŞEHU. Etlik Piliç Yemlerinde Metiyonin Kaynağı olarak 2-Hidroksi-4-(Metiltiyolo) Butanoik Asit Kullanımı (<i>Using 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid as a Source of Methionine in Broiler Diets</i>)	293 - 300	
▶ Sedat TURGUT, Yasin PARLATIR, Hasan ERDOĞAN, Serdar PAŞA. Sağlıklı Koyunlarda Fluniksine Meglumine ve Meloksikam Uygulamasının Koagülasyon Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması (<i>Investigation of the Effects of Flunixin Meglumine and Meloxicam Administration on Coagulation Profiles in Healthy Sheep</i>)	301 - 308	
▶ Selim ÇOMAKLI, Yavuz Selim SAĞLAM, Mustafa ÖZKARACA, Serdar ALTUN. Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi (<i>The Determination of Parainfluenza-3 Viral Antigens Using Immunohistochemical Methods in Cattle Lungs in Erzurum Region</i>)	309 - 316	
▶ Nusret APAYDIN, Hüseyin ERMİN. Dişi Köpeklerde İdrar Kesesi Hastalıklarının Radyografik, Ultrasonografik ve Endoskopik Yöntemlerle Belirlenmesi (<i>Determination of Methods Radiographic, Ultrasonographic and Endoscopic of Urinary Bladder Diseases in Female Dogs</i>)	317 - 325	
▶ Emin ŞENGÜL, Fikret ÇELEBİ, Ali ÇINAR. <i>Achillea millefolium</i> (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in İn Vitro Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri (<i>The Effects of Achillea millefolium (Yarrow) Extract and Luteolin on In Vitro Rat Urinary Bladder Muscles</i>)	326 - 336	
▶ Volkan GELEN, Emin ŞENGÜL, Serkan YILDIRIM, Fikret ÇELEBİ, Ali ÇINAR. Ratlarda Cyclophosphamide ile İndüklenen Hemorajik Sistitte Mesane Kontraktilitesi ve Histopatolojisi Üzerine Rutin'in Etkileri (<i>Effects of Rutin on Bladder Contractility and Histopathology in Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats</i>)	337 - 346	
▶ Mehmet Ali TEMİZ, Atilla TEMUR. Bakır Nefrotoksitesinde Melatonin ve E Vitamini'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri (<i>The Effects of Melatonin and Vitamin E on Antioxidant Parameters in Copper Nephrotoxicity</i>)	347 - 354	
▶ Cavit ARSLAN, Tuncay TUFAN. Kars İlindeki Süt İneklerinin Kış Dönemindeki Besleme İlkeleri (<i>Winter Feeding Principles of Dairy Cows in Kars Province</i>)	355 - 363	
Derlemeler / Reviews		Sayfa
		Page
▶ Zeynep ÖZDEMİR, Bünyamin TRAŞ. Behaviours of Drugs in the Milk - A Review (<i>İlaçların Sütteki Davranışları – Derleme</i>)	364 - 372	
▶ Efe KURTDEDE, Mert PEKCAN, Hilal KARAGÜL. Florun Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres ile İlişkileri (<i>Free Radicals, Reactive Oxygen Species and Relationship with Oxidative Stress</i>)	373 - 379	
▶ Nihat TELLİ, Ahmet GÜNER. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri (<i>Detection Methods of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk and Milk Products</i>)	380 - 388	
▶ Zeynep ALATAŞ, Ahmet GÜNER. Clostridium difficile: Yeni Bir Gıda Patojeni mi? (<i>Clostridium difficile: Is it a New Food-Borne Pathogen?</i>)	389 - 396	
Yıl / Year: 2018		Cilt / Volume: 13
		Sayı / @ : :



Effects of Noradrenaline on Smooth Musculature of Small and Large Intestines of Fattening Turkey Under In Vitro Conditions

Muhamed KATICA^{1✉}, Indira MUJEZINOVIC², Nedžad GRADASCEVIC³

1. University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Pathophysiology, BOSNIA AND HERZEGOVINA.

2. University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Pharmacology, BOSNIA AND HERZEGOVINA.

3. University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Radiobiology with Radiation Hygiene, Biophysics & Environmental Protection, BOSNIA AND HERZEGOVINA.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
03.11.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Katica M, Mujezinovic İ, Gradiscevic N: Effects of Noradrenaline on Smooth Musculature of Small and Large Intestines of Fattening Turkey Under In Vitro Conditions. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 257-265, 2018. DOI: 10.17094/ataunivbd.349019

Abstract: The aim of the study was to determine the possible presence of adrenergic receptors in the smooth musculature of small and large intestines of heavy hybrid turkey, using different concentrations of non-selective adrenergic receptor agonists, noradrenaline, under in vitro conditions. The research was carried out on 24 fattening turkeys. Tests of circular and longitudinal layers of muscular duodenum, jejunum, ileum, cecum and colon in the organ isolation apparatus, using different concentrations of noradrenaline hydrogentartarate solution, were tested. The research has established the presence of adrenergic receptors within the smooth musculature of the small and large intestines of fattening turkeys. The effect of the noradrenaline on the longitudinal layer was stronger ($P<0.001$) than the effect on the circular layer of *tunica muscularis* in small and large intestines of fattening turkeys. There were also statistically significant differences in the results obtained with regard to the use of different concentrations of noradrenaline. Significant differences in the effects of noradrenaline in different parts of the small and large intestines have also been established. Further research into smooth musculature of the small and large intestines of fattening turkeys is needed, with the use of selective agonists and α and β receptor antagonists.

Keywords: Adrenergic receptors, Fattening turkeys, Noradrenaline, Small and large intestines, *Tunica muscularis*.

Noradrenalinin İn Vitro Koşullar Altında Besi Hindilerinde İnce ve Kalın Bağırsak Düz Kasları Üzerine Etkisi

Öz: Bu çalışmanın amacı heavy hybrid hindilerin ince ve kalın bağırsaklarındaki düz kaslarda bulunan adrenerjik reseptörlerin olası varlığını in vitro koşullar altında farklı konsantrasyonlarda non-selektif adrenerjik reseptör agonisti, noradrenalin, kullanarak belirlemektir. Çalışma 24 besi hindisinde gerçekleştirildi. Organ izolasyon cihazında duodenum, jejunum, ileum, çekum ve kolonun müsküler longitudinal ve sirküler tabakalarında testler farklı konsantrasyonlarda noradrenalin hydrogentartarate solüsyonu kullanılarak test edildi. Çalışma besi hindilerinin ince ve kalın bağırsaklarındaki düz kaslarda bulunan adrenerjik reseptörlerin olası varlığını ortaya koydu. Noradrenalin'in longitudinal tabaka üzerindeki etkisi, besi hindilerinin ince ve kalın bağırsaklarında ki *tunica muscularis* sirküler tabaka üzerinde ki etkisinden daha güçlüydü ($P<0.001$). Farklı konsantrasyonlarda noradrenalin kullanımına ilişkin olarak elde edilen sonuçlarda da istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar vardı. Noradrenalinin ince ve kalın bağırsakların farklı bölgelerindeki etkilerinde de önemli farklılıklar bulundu. Selektif agonistler ve α ve β reseptör antagonistleri kullanılarak, besi hindilerinin ince ve kalın bağırsak düz kaslarında daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Adrenerjik reseptör, Besi hindisi, İnce ve kalın bağırsaklar, Noradrenalin, *Tunika muskularis*.

✉ Muhamed KATICA

University of Sarajevo, Veterinary Faculty, Department of Pathophysiology, BOSNIA AND HERZEGOVINA.
e-mail: muhamed.katica@vfs.unsa.ba

INTRODUCTION

The production of noradrenaline originates in part from the core of the adrenal gland, and is partially released as a neurotransmitter from postganglionic adrenergic threads (1-4). Unlike adrenaline, the principal representative of catecholamines, noradrenaline has 5 to 10 times less metabolic action (4,5).

It is a non-selective agonist and acts on the target cells through specific adrenergic receptors located on the CNS cell surface and in almost all peripheral tissues, and thus leads to blood vessel contraction in the body, increased cardiac muscle activity, relaxation of the smooth musculature of the stomach and bowels, dilation of pupils etc. (4,6,7).

In the smooth muscles of rumen of small and large ruminants in terms of distribution of adrenergic receptors, there were contrasting results depending on whether studies were conducted under *in vivo* or *in vitro* conditions. In small ruminants, specifically in sheep, the presence of adrenergic receptors in the smooth muscles of rumen was significantly higher than in comparison to cattle, where studies found receptors only in traces. Especially low levels of adrenergic receptor representation were found in the smooth muscles of dorsal and ventral bag of rumen (7,8).

Many studies have confirmed the presence, role and influence of various physiologically and pharmacologically active substances such as acetylcholine, catecholamines, histamine, serotonin, enkephalin, some prostaglandins and so on, which have the role of neurotransmitters or autacoids in digestive systems of humans and most animals. They greatly affect the motility and secretion in this part of the organism, and therefore participate in the normal maintenance of its function. In some animals this role is more known than it is in others (4,8,9).

Both adrenoceptor types (α and β) are represented in different proportions in the gastrointestinal system of domestic animals, where they participate in regulation of motorics and secretion (10,11).

Inadequate knowledge of representation and role of these substances in the functioning of digestive tract in domesticated poultry, especially turkeys, has led us to try to illuminate their role in this type of animal. In accordance with the aforementioned, the aim of the study was to determine the possible presence of adrenergic receptors in the smooth musculature of small and large intestines of heavy hybrid turkey, using different concentrations of non-selective adrenergic receptor agonist, noradrenaline, under *in vitro* conditions.

MATERIALS and METHODS

Experimental Animals

The research was carried out on 24 fattening turkeys, heavy hybrid BIG BUT 600 (British United Turkey). All the individuals used in this research came from the same parental flock.

Fattening turkeys were of a body weight between 7 and 10 kg, and of the age of 91 to 125 days. Breeding turkeys were transferred to the local poultry slaughterhouse, where they were drugged and had their neck veins transected in accordance with the regulations in force.

After the animals were sacrificed, parts of small and large intestines were taken; i.e. the duodenum, jejunum, ileum, cecum and column strips of 5 cm in size. They were then immersed in a freshly prepared *Krebs solution* and transferred to a laboratory for isolated organs. The tissue strips were taken to the procedure at farthest 20 minutes after the animal was sacrificed. Small and large intestines were cleansed of fatty and connective tissue, followed by a preparation of circular and longitudinal strip (2 cm in length and a width of about 3-4 mm) and placed in an isolated organ bathroom with a volume of 10 ml.

In order for conditions to be as close as possible, 4 strips were used simultaneously. The strips were placed in two 2-chamber baths for isolated organs of a volume of 10 ml, made by „Ugo Basile“, Italy, where

freshly prepared *Krebs solution* was found. Such suspended strips were aerated in *Krebs' solution* with a mixture of oxygen and carbon dioxide (95 % O₂ and 5% CO₂) at a constant temperature of 41 °C. In 1 hour adaptation time and 2 -gram loading period, the comics were rinsed every fifteen minutes. Movement registration was performed on a single-channel printers of isometric transducers, made by „Ugo Basile“, Italy. Vitality of the strips was verified by adding acetylcholine at a concentration of 10⁻⁵ M at the beginning and/or the end of the experiment.

After the solution of noradrenaline hydrogentartarate was used, the non-selective agonist was added to the bath of a volume of 10 ml using an insulin syringe to achieve sufficient concentrations (10⁻⁷-10⁻⁴ M). The solution of noradrenaline hydrogentartarate was then washed after one minute. The period between the individual applications lasted for about 20 minutes. For statistical data processing, researching a single substance was repeated at least six times.

Substances and Solutions Used

The following substances were used in the study: *Krebs solution* (mM): NaCl 118.4; KCl 4.7; CaCl₂ 2.5; MgSO₄ 1.2; NaHCO₃ 25; KH₂PO₄ 1.2 i glukoza 11.5 (pH 7.3 - 7.4), acetylcholine chloride (a solution that

the viability of the strips was tested with), 2-(*Acetyloxy*)-*N,N,N*-tri-methylethanaminum chloride (F. Hoffmann-la Roche & Co. Ltd. Basle Switzerland) and noradrenaline hydrogentartarate (non-selective agonist), (R)-4-(2-Amino-1-hydroxyethyl)-1,2-benzenediol (Sigma-Aldrich, Germany). All the substances used in the experiment were dissolved in distilled water.

Statistical Analysis

The results were processed in the Minitab 14® (12). Two-factor variance analysis (ANOVA Two-way) was used with a post hoc Tukey test to detect the significance of differences between group pairs.

RESULTS

Results of the effects of noradrenaline on smooth musculature of duodenum

By applying the concentration of noradrenaline (10⁻⁷ -10⁻⁶ M) to the longitudinal and circular muscular layers of duodenum, no reaction was found, but at higher concentrations of 10⁻⁵ - 10⁻⁴ M, both muscular layers were less responsive in terms of relaxation, with longitudinal layer being slightly more sensitive, as can be seen in Figure 1. (A) and (B), as well as in Table 1.

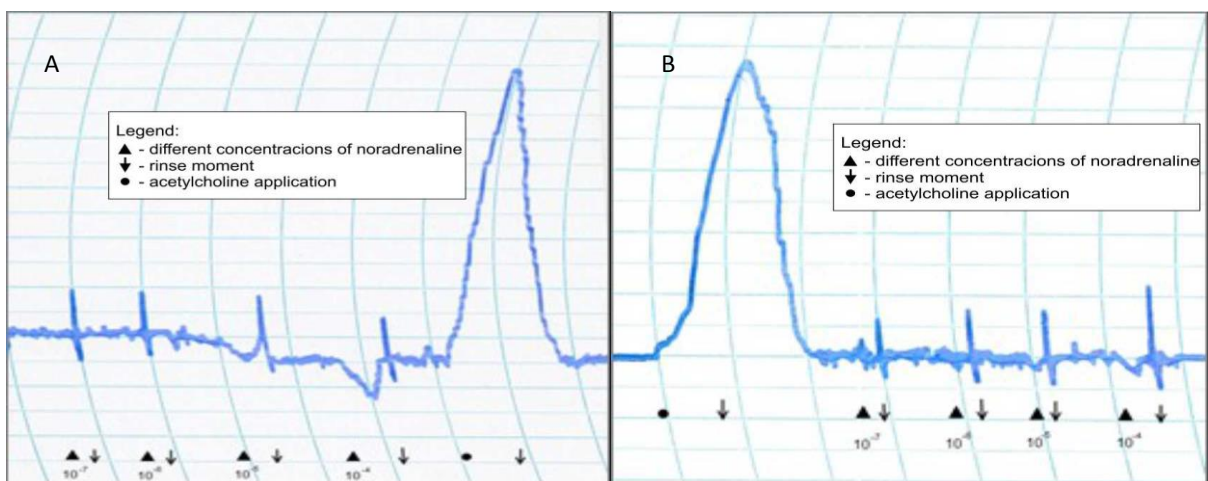


Figure 1. The application of noadrenaline at different concentrations (▲ 10⁻⁷- 10⁻⁴) to the longitudinal (A) and circular (B) muscular layer of duodenum of a fattening turkey.

Şekil 1. Besi hindi duedonum longitudinal (A) ve sirküler (B) kas tabakasına farklı konsantrasyonlarda noradrenalin (▲ 10⁻⁷ - 10⁻⁴) uygulaması.

Results of the effect of noradrenaline on the smooth musculature of jejunum.

From Figure 2. (A) and (B), as well as from Table 1., it can be seen that the circular layer of jejunum was less responsive to different concentrations of

noradrenaline in comparison to the longitudinal layer. By applying higher concentrations of noradrenaline 10^{-5} - 10^{-4} M, greater relaxation occurred in the longitudinal layer.

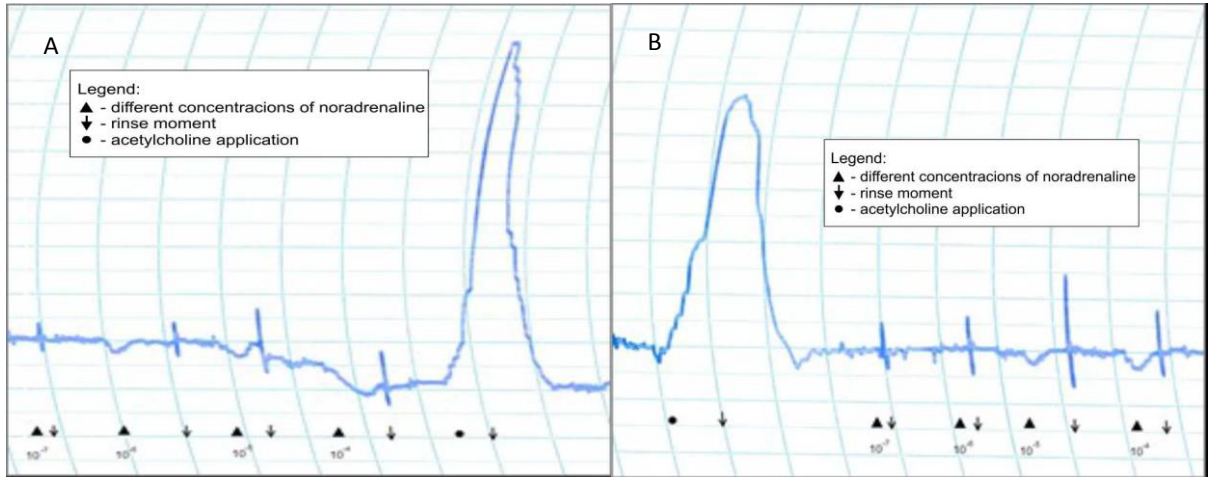


Figure 2. The application of noradrenaline at different concentrations (\blacktriangle 10^{-7} - 10^{-4}) to the longitudinal (A) and circular (B) muscular layer of jejunum of a fattening turkey.

Şekil 2. Besi hindi jejenum longitudinal (A) ve sirküler (B) kas tabakasına farklı konsantrasyonlarda noradrenalin (\blacktriangle 10^{-7} - 10^{-4}) uygulaması.

Results of the effects of noradrenaline on the smooth musculature of ileum.

Both muscular layers of ileum react similarly in terms of relaxation at different concentrations of noradrenaline, as well as in other small intestine

parts. The circular layer reacted with weaker reactions, while the longitudinal layer at the highest concentration of 10^{-4} M reached the maximum response, as shown in Figure 3. (A), as well as in Table 1.

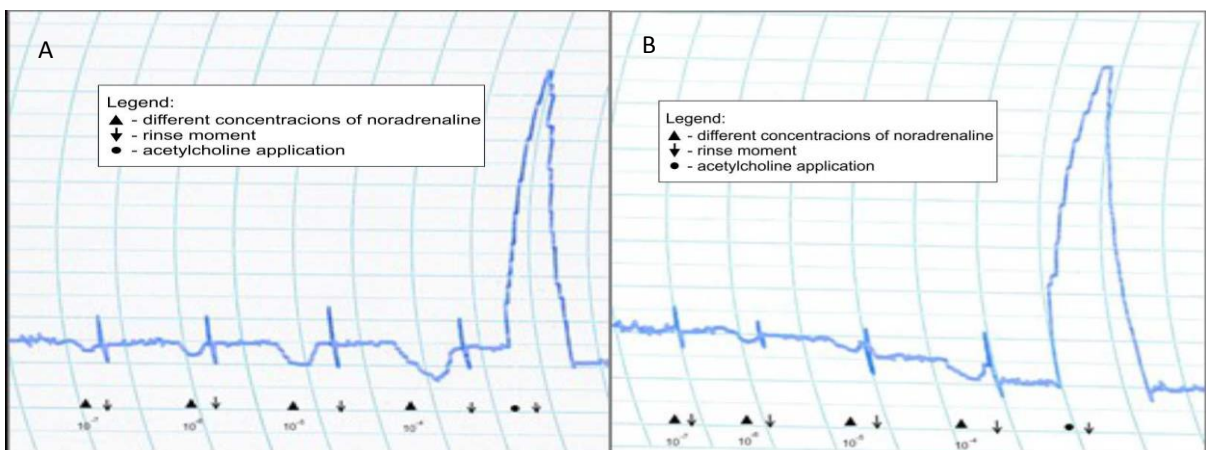


Figure 3. The application of noradrenaline at different concentrations (\blacktriangle 10^{-7} - 10^{-4}) to the longitudinal (A) and circular (B) muscular layer of ileum of a fattening turkey.

Şekil 3. Besi hindi ileum longitudinal (A) ve sirküler (B) kas tabakasına farklı konsantrasyonlarda noradrenalin (\blacktriangle 10^{-7} - 10^{-4}) uygulaması.

Results of the effects of noradrenaline on smooth musculature of cecum

By applying different concentrations of noradrenaline to the muscular layer of cecum, Figure 4. (A) and (B), as well as Table 1. show uniform reactions of both muscular layers in terms of

relaxation. In the muscular part of cecum, longitudinal layer had more intense responses at higher concentrations of 10^{-5} - 10^{-4} M, unlike the circular layer which did not give a response to the noradrenaline of 10^{-7} - 10^{-6} M.

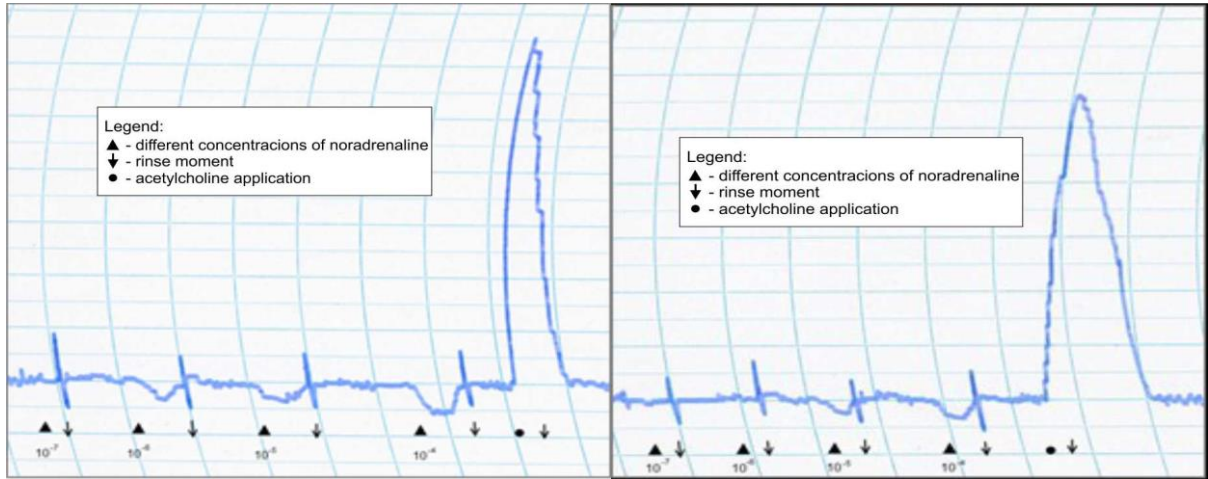


Figure 4. The application of noradrenaline at different concentrations (▲ 10^{-7} - 10^{-4}) to the longitudinal (A) and circular (B) muscular layer of cecum of a fattening turkey.

Şekil 4. Besi hindi çekum longitudinal (A) ve sirküler (B) kas tabakasına farklı konsantrasyonlarda noradrenalin (▲ 10^{-7} - 10^{-4}) uygulaması.

Results of the effects of noradrenaline on the smooth musculature of colon

In Figure 5. (A) and (B), as well as in Table 1., it can be seen that both muscular layers of colon did

not respond to the concentration of noradrenaline 10^{-7} - 10^{-6} M. At higher concentrations of 10^{-5} - 10^{-4} M both the circular and longitudinal layers reacted equally in terms of relaxation.

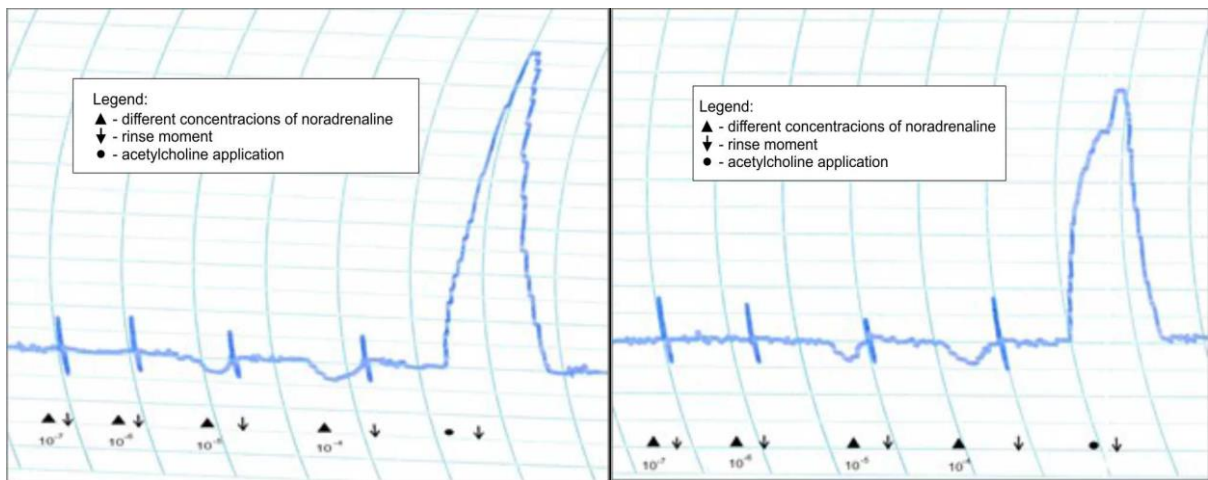


Figure 5. The application of noradrenaline at different concentrations (▲ 10^{-7} - 10^{-4}) to the longitudinal (A) and circular (B) muscular layer of colon of a fattening turkey.

Şekil 5. Besi hindi kolon longitudinal (A) ve sirküler (B) kas tabakasına farklı konsantrasyonlarda noradrenalin (▲ 10^{-7} - 10^{-4}) uygulaması.

Table 1. Mean values (%) of different concentrations of noradrenaline compared to the maximum response (100%), as well as P≤ of small intestines of fattening turkeys.
Tablo 1. Farklı noradrenalin konsantrasyonlarının ortalama değerlerine (%) göre maksimum yanıtın (%100) ve aynı zamanda besi hindilerinin ince bağırsaklarının P≤'lerinin karşılaştırılması

Conc.	Duodenum				Jejunum				Ileum				Ceacum				Colon				p≤		
	Circ layer	SD	Long layer	SD	Circ layer	SD	Long layer	SD	Circ layer	SD	Long layer	SD	Circ layer	SD	Long layer	SD	Circ layer	SD	Long layer	SD	Int.	musc	Int. × musc
10-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	22.00	0.21	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.001	0.001	0.001
10-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	28.00	1.58	20.00	2.37	40.00	0.70	0.00	0.00	33.33	2.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.001	0.001	0.001
10-5	6.66	1.22	66.66	2.09	33.33	1.67	40.00	1.58	43.33	2.75	66.66	3.72	30.00	0.79	40.00	0.70	46.66	2.53	40.00	0.03	0.001	0.001	0.001
10-4	26.66	1.91	76.66	2.54	41.33	1.48	70.00	0.50	60.00	1.76	100.0	0,00	53.33	0.80	66.66	2.34	56.66	1.04	60.00	0.91	0.001	0.001	0.001

SD - Standard deviation; Circ layer- Circular layer; Long layer - Longitudinal layer; Int. - Intestine; musc- T. muscularis.

DISCUSSION and CONCLUSION

The effects of catecholamines (natural, artificial) or adrenergic drugs in the body can occur due to direct action on adrenergic receptors or indirectly by stimulating the release of catecholamines from adrenergic neurons. Catecholamines and other medicinal substances their effects on digestive tract achieve by acting on adrenergic α and β receptors (13-15).

The primary task of this study was to investigate direct action on adrenoreceptors while the indirect mechanisms of catecholamine action were not considered.

In the original, scanned readouts, clearly established are reactions of both layers of *tunica muscularis*, in terms of relaxation, indicating the apparent presence of adrenergic receptors in small and large intestines of the heavy hybrid turkeys of the BIG BUT 600 origin. The obtained results showed that tested tissue did not react at the noradrenaline concentration level of 10^{-7} M, except in the longitudinal layer of *tunica muscularis* ileum. With increasing noradrenaline concentrations, the effects of relaxation were more pronounced. The concentration of noradrenaline significantly influenced its effect on smooth musculature irrespective of the intestinal part and the muscular layer.

In addition to the above, the analysis of the effect of noradrenaline significantly differs depending on the intestinal part and that its effect is significantly different in different layers of *tunica muscularis*. The recorded interaction between the intestinal part and the muscular layer was also significant.

The effect of noradrenaline on the longitudinal layer was stronger than the effect on the circular layer of *tunica muscularis*, irrespective of the concentration and part of the intestine. The same effect was also present when the parts of the bowels were observed individually, except for the colon where the effect on circular musculature was slightly more pronounced. The effect of noradrenaline

significantly differed in different parts of the small intestine, irrespective of the concentration and the muscular layer, and was significantly more pronounced in the musculature of the ileum than in the other parts of the intestine.

The effect of noradrenaline on circular musculature was different depending on the part of the intestine, regardless of the concentration. The weakest effect was found in duodenum, and the strongest in ileum.

The results of the research correspond to similar research, Katica (9) where measured were the effects of other types of synthetic catecholamines (adrenaline) on the smooth musculature of small and large intestines of fattening turkeys. Maximum relaxation occurred in the longitudinal layer of ileum at 10^{-3} M adrenaline concentration, which is fully compatible with the maximum relaxation of this study with the concentration of noradrenaline at 10^{-4} M. Since noradrenaline has several times weaker metabolic activity than adrenaline (4,5), there is a clear difference in the efficacy of adrenaline and noradrenaline concentrations.

The differences between these two studies are manifested in different effects on smooth musculature when using different concentrations of noradrenaline and adrenaline. The effects of adrenaline in some segments of the small intestinal tract (concentration of 10^{-6} M) (9) had the same or greater effect in comparison to the noradrenaline (concentration of 10^{-4} M) in this study.

Likewise, comparing to other similar research, such as Mujezinović (4), a partial correlation was found between the presence of adrenergic receptors in circular and longitudinal layers of *tunica muscularis* in small intestine of heavy hybrid turkeys and broilers. According to Mujezinović (4), different concentrations of noradrenaline (10^{-7} - 10^{-4} M) did not produce any effects in the circular layer of *tunica muscularis* of duodenum, jejunum and ileum of the broilers, indicating the absence of adrenergic receptors in that part of the smooth musculature. In this study, it was established that the concentrations

of noradrenaline (10^{-5} - 10^{-4} M) in the same tissues of fattening turkeys produced effects of less relaxation indicating dose and response immutability (the so-called dose-response link), or presence of adrenergic receptors. By analyzing the results in the longitudinal layer of the small intestine of fattening turkeys and broilers, it was established that the results obtained were fully compatible, just like the maximum response (relaxation), indicating the most sensitive part; longitudinal layer of smooth musculature of ileum, or the place of the highest representation of the examined receptors in both species of tested animals.

The results of the research on the distribution of adrenergic receptors in large intestine (*caecum*) of fattening turkeys are consistent with similar research, Katica (10).

In conclusion, it could be stated that research established a presence of adrenergic receptors within the smooth musculature of the small and large intestines of fattening turkeys, the provenance (BIG BUT 600). Further, more precise research with the use of selective agonists and α and β receptor antagonists is necessary. More precise information on the presence of α and β receptors in this part of *tubus alimentarius* could ultimately be the basis for potential introduction of new, more effective drugs in the treatment of impaired bowel function in turkeys.

REFERENCES

1. Cupic V., Muminovic M., Kobal S., Velev R., 2014. Textbook of Veterinary Pharmacology. Belgrade, Sarajevo, Ljubljana, Skopje, 2nd edn., p. 291-294, 304-305, National Library of Serbia, Belgrade.
2. Gvozdic D., 2012. Pathophysiology of Endocrinology System. In.: Bozic T., Textbook of Pathophysiology of domestic animals. 2nd edn., p. 394-396, Mladost Biro d.o.o., Belgrade, Serbia.
3. Hodzic A., Hamamdzic M., 2012. Endocrinology of domestic animals. p. 80-97, University textbook, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
4. Mujezinovic I., 2007. The impact of physiological and pharmacological active substances and their antagonists in the small intestine smooth muscle of broilers. University of Sarajevo, Faculty of Veterinary Medicine, Bosnia and Herzegovina.
5. Guyton AC., Hall JE., 2003. Textbook of Medical Physiology. 10th edn., p. 408-418, Medicinska naklada, Zagreb, Croatia.
6. Bylund DB., Eikenberg DC., Hieble JP., Langer SZ., Lefkowitz RJ., Minneman KP., Molinoff PB., Ruffolo RR., Trendelenburg AU., 1994. IV. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. Pharmacol Rev, 46, 121-136.
7. Katica M., Katica A., Mlaco N., 2016. The role of catecholamines in maintenance of homeostasis in digestive tract of domestic animals. Atatürk University Journal of Veterinary Sciences., 11, 106-111.
8. Muminovic M., 1991. The effects of physiological and pharmacological active substances and some of their antagonists in the rumen of cattle in order to improve pharmacotherapy. University of Sarajevo, Faculty of Veterinary Medicine, Bosnia and Herzegovina.
9. Katica M., 2015. Testing the effects of physiologically and pharmacologically active substances and their antagonists in smooth intestine musculature during the turkey fattening phase. University of Sarajevo, Faculty of Veterinary Medicine, Bosnia and Herzegovina.
10. Katica M., 2015. Presence of adrenergic receptors in the wall of caecum during Turkey Fattening Phase. International Congress, One World-One Health-One Vision, Book of Abstracts, p. 113- 115, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina.
11. Bylund DB., 2005. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? British J Pharmacol, 144, 159-160.
12. Minitab Inc., 2003. Minitab Statistical Software. Release 14 for Windows, State College, Pennsylvania.
13. MA PM., 1997. Catecholaminergic systems in the zebrafish. III Organization and projection pattern

- of medullary dopaminergic and noradrenergic neurons. *J Comp Neurol*, 381, 411-427.
14. Manara L., Croci T., Aureggi G., Guagnini F., MaVrand JP., Le Fur G., Mukenge S., Ferla G., 2000. Functional assessment of adrenoceptor subtypes in huma colonic circular and longitudinal (taenia coli) smooth muscle. *Gut*, 47, 337-342.
 15. De Ponti F., Giaroni C., Cosentino M., Lesshini S., Frigo G., 1996. Adrenergic mechanism in the control of gastrointestinal motility: From basic science to clinical application. *Pharmacol Therapeutics*, 69, 1, 59-78.



The Effects of Dietary Vitamin E and Organic Selenium on the Levels of Some Bioelements in Tissues of Laying Hens*

Necati UTLU¹✉, Şaban ÇELEBİ², Menekşe SOYDAN³, Esra AKTAŞ ŞENOCAK³

1. Atatürk University, Vocational School Health Services, Medical Laboratory, Erzurum, TURKEY.
2. Ataturk University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Erzurum, TURKEY.
3. Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Erzurum, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
25.10.2017	31.01.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

UTLU N, ÇELEBİ Ş, SOYDAN M, AKTAŞ ŞENOCAK E: The Effects of Dietary Vitamin E and Organic Selenium on the Levels of Some Bioelements in Tissues of Laying Hens. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 266-273, 2018. DOI: 10.17094/ataunivbd.346598

Abstract: This experiment was conducted to evaluate the effects of dietary vitamin E (α -tocopherol acetate), organic selenium (selenomethionine) and their combination on some bioelements in some tissues of laying hens. Ninety-six white Lohman LSL laying hens aged of 24 weeks were randomly divided into 4 equal groups. The groups were fed with the diets consisting of basal diet (Control), basal diet + 250 mg/kg Vit-E (Trial-I), basal diet + 0.9mg/kg Se (Trial-II) and basal diet + 250 mg/kg Vit-E + 0,9 mg/kg Se (Trial-III), respectively. At the end of the experiment, 12 laying hens from each group were sacrificed, and aforementioned tissues were collected and stored at -20 °C until analyzes. In tissue samples bioelements levels were determined by ICP-MS. It was found out that when the treatment and control groups were compared in terms of bioelements in some important tissues while Se, Zn and Fe levels increased ($P<0.05$) and the levels of Cu decreased in the tissues of treatment groups ($P<0.05$). In addition, the levels of Ca and Mg were not affected by treatment in present study. Organic selenium and vitamin E, consideration of antagonist and synergistic effects of bioelement levels changes in tissues.

Keywords: Bioelements, Laying hen, Organic selenium, Tissue samples, Vitamin E.

Diyetsel Vitamin E ve Organik Selenyumun Yumurta Tavuğu dokularındaki Bazı Biyoelement Düzeyleri Üzerine Etkileri

Özet: Bu çalışma, diyetsel vitamini E (a-tokoferol asetat), organik selenyum (selenomethionine) ve bunların kombinasyonlarının yumurta tavuklarının bazı dokularında bazı biyoelementlerin düzeyleri üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla yapıldı. Çalışmada, 96 adet beyaz Lohman yumurta tavuğu, eşit sayıda 4 gruba ayrıldı. Gruplar sırasıyla bazal yem (Kontrol), bazal yem + 250 mg/kg Vit-E (D-I), bazal yem + 0.9 mg/kg Se (DII) ve bazal yem + 250 mg/kg Vit-E+ 0.9 mg/ kg Se (D-III) içeren rasyonlarla beslendi. Deneme sonunda, her gruptan 12 hayvan kesildi, belirtilen dokular alındı, analiz edilinceye kadar -20 °C'de saklandı ve biyoelement düzeyleri ICP-MS ile analiz edildi. Deneme gruplarının dokularındaki Se, Zn ve Fe düzeyleri kontrol grubuna göre önemli derecede artarken ($P<0.05$), Cu düzeylerinin azaldığı ($P<0.05$), Ca ve Mg düzeylerinin ise muameleden etkilenmediği bulundu. Organik selenyumun ve vitamin E'nin, dokularda biyoelement düzeylerindeki değişmelerin oluşturacağı antagonist ve sinerjik etkilerinin dikkate alınması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoelementler, Doku örnekleri, E vitamini, Organik selenyum, Yumurta tavuğu.

✉ Necati UTLU

Atatürk University, Vocational School Health Services, Medical Laboratory, Erzurum, TURKEY.
E-mail: nutlu@atauni.edu.tr

* The financial source of this study was supported by Ataturk University Scientific Research Projects Unit (PROJECT NO: 2015/084).
In I. International Iğdır Symposium presented as an oral presentation

INTRODUCTION

Bioelements play a role in many important physiological functions such as vitamin synthesis in organism, hormone production, and enzyme activity, regulation of cell osmotic pressure, tissue synthesis, energy production and growth (1,2). The levels of minerals in the body are affected by stress levels, species, race, age, gender, age of somatic development, pregnancy, lactation, disease, chemical form, interaction with other nutrients, rational quantities and other minerals (3,4). Bioelements increase resistance to diseases in living beings and deficiencies and excesses cause serious health problems (5,6). Selenium is the cofactor of many enzymes that play a role, especially glutathione peroxidase, functions of nucleic acids, synthesis of prostaglandins and metabolism of essential fatty acids and an antioxidant that nerves the immune system of hens and protects the membranes (7-12). The amount of Se in vegetable and animal products shows a wide variation and the amount of Se in plants is influenced by the amount of selenium in the feed sources used while the amount of Se in animal foods is influenced by the amount of selenium in the animal sources (13). Functions of vitamin E in the body; preventing free radicals from entering the cell membrane and acquiring DNA management therefrom, providing lipid peroxidation (7,14), by decreasing the oxidation of vitamin A and carotene, to protect the biological systems in the body and to reduce the loss of Ca in the bone caused by oxidizing agents (15). Vitamin E has an increasingly important role in increasing biological antioxidant and reproductive power in the poultry diet, increasing resistance to infectious mechanisms, resistance to infectious and metabolic diseases, increased meat quality, meat colour effect and shelf life (16). Urso et al. (17) reported that hatchability of the eggs of breeders fed with diet including 120 mg vitamin E/kg feed was higher than those fed with diet containing 30 mg vitamin E/kg of feed. Most of the earlier studies report that dietary vitamin E

supplementation of a balanced poultry ration significantly supports reproductive functions, including semen volume, sperm concentration, sperm viability, sperm motility, and sperm capacity, in avian species (14,18). The vitamin E is getting substantial interest in poultry nutrition due to its key-role as a dietary antioxidant to prevent oxidative stress (19). Vitamin E is a well-documented fat-soluble antioxidant and has been shown to inhibit free radical-induced damage to sensitive cell membranes (14,20). Vitamin E is supplemented to the diet to maintain and enhance performance in layers, broilers, broiler breeders, and turkey (21,22). The results obtained from the earlier studies varied depending upon the level and duration of feeding diets supplemented with vitamin E, genetic stocks, age, assessment criteria and stress conditions (20,21). The aim of this study was to investigate the effects of vitamin E, organic selenium and their combination added into diets of laying hens on the bioelement levels of different tissues.

MATERIALS and METHODS

The Research Animal Ethic Committee of Atatürk University approved all procedures under this experimental protocol (dated 31.07.2017 and numbered 36643897-128). A total of 96 White Lohman hens aged 24 weeks were randomly assigned to one of the four experimental diets for a periods of 12 weeks (n=24). Within a given group, 6 subgroups of 4 hens each were constituted and hens were housed in 50x46x46 cm³cages. Hens of the group-I served as control and received the basal diet (2770 kcal/kg ME and 17% crude protein). Whereas other groups (T-II, T-III, T-IV) were fed with 3 different rations consisting of basal diet + 250 mg/kg vitamin E (Vit-E, α -tocopherol acetate) (trial-II), basal diet + 0.9 mg/kg selenium (selenomethionine) (Trial-III) and basal diet + 250 mg/kg Vit-E + 0.9 mg/kg Se (Trial-IV), respectively. Experiment lasted for 12 weeks. Diet and water were provided as ad libitum (Table I). At

the end of the study, 12 hens from each group were sacrificed and aforementioned tissues were collected and stored at -20 °C until analyzes. In tissue samples, bioelement levels were analyzed by ICP-MS (Perkin-Elmer, Optima 2100 DV, ICP / OES, Shelton, CT 06484-4794, USA). Data obtained from the experiment were

analyzed using the SPSS Statistics 17.0 program. Statistical significance and significance levels were determined by the "One-way analysis of variance (ANOVA)" test, and $P < 0.05$ was considered significant. Duncan test was applied for multiple comparisons.

Table 1. Ingredients and nutrient levels of the rations used in the experiment.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan rasyonların besin madde kompozisyonları ve bileşimleri.

Raw Materials	Vitamin E and Se (mg / kg)			
	Control	Trial-I	Trial-II	Trial-III
Vitamin E (α -tocopherol acetate) (mg/kg)	-----	250	-----	250
Selenium (mg/kg) (selenomethionine)	-----	-----	0,9	0,9
Wheat Bran	8.00	8.00	8.00	8.00
Corn	51.81	51.81	51.81	51.81
Soybean Meal	17.13	17.13	17.13	17.13
Full Fat Soy	1.65	1.65	1.65	1.65
Sunflower Meal	7.50	7.50	7.50	7.50
Corn Gluten	2.04	2.04	2.04	2.04
Soybean Oil	1.60	1.60	1.60	1.60
Ground Limestone	6.82	6.82	6.82	6.82
Salt	0.30	0.30	0.30	0.30
DCP (Dicalcium Phosphate)	2.65	2.65	2.65	2.65
Methionine	0.15	0.15	0.15	0.15
Lisin	0.10	0.10	0.10	0.10
Vitamin-Mineral Mixture ^a	0.25	0.25	0.25	0.25
Calculated Values (on dry matter basis)				
Metabolic Energy(Kcal/kg feed)	2770	2770	2770	2770
Crude Protein (%)	17.00	17.00	17.00	17.00

^a: Each kg mineral-vitamin premix contained: vitamin A, 5,500 IU; vitamin D3, 1,100 IU; vitamin E, 10 IU; riboflavin, 4.4 mg; vitamin B₁₂, 12 mg; nikotinik acid, 44 mg; menadione, 1.1 mg; biotin, 0.11 mg; tiyamin, 2.2 mg; ve ethoxyquin, 125 mg, Mn, 120 mg; Zn, 100 mg; Fe, 60 mg; Cu, 10 mg; Se, 0.17 mg; I, 0.46 mg; ve Ca, 150-180 mg.

RESULTS

The results related to mineral concentrations of liver, kidney, heart, breast, tibia and feather tissues of laying hens fed with diets including vitamin E, Se or their combination were presented in Table II, Table III and Table IV. The mineral concentrations except for Ca and Mg in the tissues of the experimental groups compared to the control group were statistically different ($P < 0.05$). Whereas the Ca

and Mg concentrations in all groups were not affected by the treatment. Both selenium and vitamin E supplementation significantly increased Se concentrations in aforesaid tissues. Also, dietary selenium and vitamin E supplementation significantly increased Zn and Fe concentrations in all of the tissues. Both dietary organic selenium and vitamin E supplementation significantly decreased Cu concentrations in all studied tissues of experimental groups when compared to control group.

Table 2. Effect of vitamin E and selenium supplement on Se, Cu, Zn, Fe, Ca and Mg levels of liver and kidney tissues of laying hens.**Tablo 2.** Vitamin E ve selenyum ilavesinin yumurtacı tavukların karaciğer ve böbrek dokularında Se, Cu, Zn, Fe, Ca ve Mg düzeylerine etkisi.

Groups	Liver Tissue (n=12)				Kidney Tissue (n=12)				SEM	P
	CO	T-I	T-II	T-III	CO	T-I	T-II	T-III		
Se (ppm)	26.7 ^d	36.2 ^c	42.8 ^a	40.8 ^b	14.3 ^d	16.8 ^c	52.4 ^a	40.7 ^b	2.98	*
Cu (ppm)	16.5 ^b	14.5 ^a	13.8 ^a	13.7 ^a	2.43 ^a	1.46 ^b	1.50 ^b	1.58 ^b	3.02	*
Zn (ppm)	245.8 ^b	255.7 ^a	285.0 ^a	275.0 ^a	31.3 ^c	35.8 ^b	44.5 ^a	43.2 ^a	38.0	*
Fe (ppm)	105.7 ^c	124.3 ^b	126.8 ^{a,b}	127.2 ^a	76.8 ^b	86.8 ^a	86.2 ^a	87.9 ^a	18.5	*
Ca (mg/g)	11.7	11.6	11.8	11.9	15.9	14.9	15.3	15.5	0.25	NS
Mg (mg/g)	32.6	31.7	32.3	32.4	3.39	3.17	3.55	3.36	8.5	NS

CO (control): Basal diet, T-I (Trial-I): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E, T-II (Trial-II): Basal diet + 0.9 mg/kg Se, T-III (Trial-III): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E + 0.9 mg/kg Se^{a,b,c}. Different superscripts in each row shows the significant difference between the groups *P<0.05, NS: Not significant. Se (selenyum), Cu (bakır), Zn (çinko), Fe (Demir), Ca (kalsiyum), Mg (magnezyum).**TABLE 3.** Effect of vitamin E and selenium supplement on Se, Cu, Zn, Fe, Ca and Mg levels of heart and breast tissues of laying hens.**Tablo 3.** Vitamin E ve selenyum ilavesinin yumurtacı tavukların kalp ve göğüs dokularında Se, Cu, Zn, Fe, Ca ve Mg düzeylerine etkisi.

Groups	Heart Tissue (n=12)				Breast Tissue (n=12)				SEM	P
	CO	T-I	T-II	T-III	CO	T-I	T-II	T-III		
Se (ppm)	14.6 ^c	21.9 ^b	44.4 ^a	42.6 ^a	3.50 ^b	4.02 ^a	5.65 ^a	4.70 ^a	3.21	*
Cu (ppm)	2.23 ^a	1.66 ^b	1.60 ^b	1.68 ^b	22.7 ^a	17.1 ^b	15.0 ^c	16.2 ^b	0.15	*
Zn (ppm)	21.3 ^c	22.6 ^b	24.5 ^a	23.2 ^b	123 ^d	133 ^c	150 ^a	143 ^b	0.46	*
Fe (ppm)	76.8 ^b	86.8 ^a	86.2 ^a	86.9 ^a	116 ^c	125 ^b	140 ^a	127 ^b	1.54	*
Ca (mg/g)	15.9	14.9	15.3	15.6	11.9	11.7	11.8	11.7	0.93	NS
Mg (mg/g)	3.31	3.17	3.55	3.36	23.5	22.9	23.1	22.6	0.49	NS

CO (control): Basal diet, T-I (Trial-I): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E, T-II (Trial-II): Basal diet + 0.9 mg/kg Se, T-III (Trial-III): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E + 0.9 mg/kg Se^{a,b,c}. Different superscripts in each row shows the significant difference between the groups *P<0.05, NS: Not significant. Se (selenyum), Cu (bakır), Zn (çinko), Fe (Demir), Ca (kalsiyum), Mg (magnezyum).**Table 4.** Effect of vitamin E and organic selenium supplement on Se, Cu, Zn, Fe, Ca and Mg levels of tibia and feather tissues of laying hens.**Tablo 4.** Vitamin E ve selenyum ilavesinin yumurtacı tavukların tibia ve tüy dokularında Se, Cu, Zn, Fe, Ca ve Mg düzeylerine etkisi.

Groups	Tibia Tissue (n=12)				Feather Tissue (n=12)				SEM	P
	CO	T-I	T-II	T-III	CO	T-I	T-II	T-III		
Se (ppm)	0.71 ^d	1.14 ^c	5.36 ^a	5.36 ^a	0.50 ^d	1.02 ^c	5.46 ^a	2.20 ^b	0.13	*
Cu (ppm)	38.0 ^a	30.3 ^b	25.8 ^c	25.8 ^c	3.67 ^a	2.19 ^b	1.04 ^c	2.25 ^b	0.28	*
Zn (ppm)	225 ^c	235 ^b	247 ^a	247 ^a	22.8 ^c	27.8 ^b	31.9 ^a	30.9 ^a	0.08	*
Fe (ppm)	260 ^c	275 ^b	285 ^a	285 ^a	56.6 ^c	67.2 ^b	73.9 ^a	68.7 ^b	0.90	*
Ca (mg/g)	11.7	11.6	11.6	11.6	4.9	4.77	4.75	4.67	0.28	NS
Mg (mg/g)	7.25	7.33	7.40	7.37	7.54	7.33	7.10	7.42	2.35	NS

CO (control): Basal diet, T-I (Trial-I): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E, T-II (Trial-II): Basal diet + 0.9 mg/kg Se, T-III (Trial-III): Basal diet + 250 mg/kg Vit-E + 0.9 mg/kg Se^{a,b,c}. Different superscripts in each row shows the significant difference between the groups *P<0.05, NS: Not significant. Se (selenyum), Cu (bakır), Zn (çinko), Fe (Demir), Ca (kalsiyum), Mg (magnezyum).

DISCUSSION and CONCLUSION

The selenium's antioxidant properties, high biocompatibility, accumulation rates in tissues and low toxicity have made it more advantageous to use as organic selenium (selenomethionine) (22-24). The

findings about mineral concentrations of liver, kidney, heart, breast, tibia and feather tissues of laying hens fed with diets including vitamin E, Se or their combination were given in Table 2, Table 3 and Table 4. In this study, Ca and Mg concentrations of

liver, kidney, heart, breast, tibia and feather were not affected by dietary treatment and remained relatively similar in all groups. Because the metabolisms of macro-minerals such as Ca and P are regulated by hormonal metabolism like PTH, calcitonin and vit-D₃ (25). Whereas both selenium and vitamin E supplementation increased Se concentration in experimental groups when compared with control group. Specially vitamin E supplementation into the diet markedly increased Se concentration in tissues of treatment groups. Some authors reported that vitamin E supplementation into diets of laying hens and broiler promoted Se concentration in some tissues. Vitamin E has the effect of saving Se and this effect may be related to vitamin E achieving the effect of elevating Se concentrations by providing less use of glutathione peroxidase by primarily inhibiting lipid peroxidation in cells membrane from free radicals and oxidative damage. Also it is well known that vitamin E has vanguard antioxidant effect that protects cells membrane from free radicals by primarily inhibiting lipid peroxidation (26,27). These results were in agreement with previous studies (28-32) conducted on laying hens, broilers and rats. Bou et al. (28) studied the effects of different levels of Se and a Zn supplementation into diets of hens and determined a significant increase of Se concentration in tissues with the addition of both minerals. Dagdas et al. (29) reported that different levels of seleno-methionine (0, 0.25, 0.50 and 1.0 mg/kg) and Vit-E (0, 200, 400 IU/kg) supplementation into broiler diets significantly increased the serum and pancreatic Se concentration. Surai (30) reported that Se concentrations of liver and egg yolk were elevated in hens fed on diets supplemented with organic Se and vitamin E. Also Pan et al. (31) and Petrovic et al. (32) noted that the additions of organic Se (0, 0.2, 0.50 and 1.0 mg/kg) to laying hen diets significantly increased Se concentrations in liver, kidney, spleen, heart and breast muscles. At the same time diets including both Se and vitamin E significantly increased Zn and Fe concentrations and decreased

Cu concentration in all tissues. In present study, Se and vitamin E significantly increased Zn and Fe concentrations. This increase may cause to a decrease in Cu concentration. Some researchers (33-39) reported that there was a negative relationship not only between Zn and Cu both also Fe and Cu. Sahin et al. (33,34,35), noted that there was an inverse relationship between copper and vitamin E in liver. Also, Ozcelik et al. (36), Skrivanov et al. (37,38) and Spears (39) observed that copper supplementation in poultry diets showed a negative relationship not only between Cu and Zn but also Cu and Fe in tissues. It has been reported that the negative relationship among minerals in the tissues is due to the fact that the minerals form insoluble complexes in the digestive system among themselves (38). These results were in agreement with findings of Harsini (40) who expressed that vitamin E and Se addition to broiler diets significantly increased serum Se and Fe concentrations but decreased Cu concentrations. Kotyzoza et al. (41) noted an increase in hepatic Cu concentration in the absence of long-term Se in rats. Pappas et al. (42) found that organic Se added into diets had a positive effect on Se in blood, chest and liver specimens, and positively correlated with Zn, Cu and Fe levels. A positive correlation between Se-Zn in present study is consistent with finding of some researchers (28,42). This positive Se-Zn correlation may be attributed to metallothionein-induced synthesis by Zn and other cations (43). In general, Results from present study indicate that the addition of organic selenium and vitamin E to the diets of laying hens significantly increased the concentration of selenium in poultry products, and the products of these animals being important in terms of Se source for human showed that vitamin E had Se saving properties. Supplementing dietary vitamin E and Se have such beneficial effects when trace elements were carefully used in poultry diets. Because deficiency or supplementation of one of them may alter their balance and trigger antagonistic or synergistic effects, alteration of trace element balance may

effect the antioxidant defense system. In addition, several trace elements (Se, Fe, Cu and Zn) are integral part of various antioxidant enzymes.

In Conclusion, organic selenium and vitamin E, consideration of antagonist and synergistic effects of bioelement levels changes in tissues and increasing the quality of animal products and extending the shelf life, it is suggested to add laying hens rations alone and in combination.

REFERENCES

1. Korhonen H., 2002. Technology options for new nutritional concept. *Int J Dairy Technol*, 55, 79-87.
2. Kara A., Hira F., Şimşek N., Gümüş R., 2013. A histochemical and histometric study on small intestine morphology by feeding organic and inorganic copper, zinc and manganese sources in laying hens. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 8, 53-61.
3. Acıkgöz Z., Onenç SS., 2006. Functional egg production. *J. Anim. Prod.*, 47, 36-46.
4. Tekeli A., Yıldız G., 2012. Egg nutritional value and health-enhancing components. *Feed Mag.*, 63, 48-56.
5. Hira F., Yörük AM., 2015. The effect of different levels of inorganic and organic copper, zinc and manganese on egg production and quality in laying hens. *Ataturk Universitesi Vet Bil Derg*, 10, 77-87.
6. Costa FGP., Nobre IS., Silva LPG., 2008. The use of prebiotic and organic minerals in rations for Japanese laying quail. *Int J Poult Sci*, 7, 339-343.
7. Kasnak C., Palamutoglu R., 2015. Classification of natural antioxidants and their effects on human health. *Turk J Food Sci Tech*, 3, 226-234.
8. Habibian M., Sadeghi G., Ghazi S., Moeini MM., 2015. Selenium as a feed supplement for heat-stressed poultry. *Biol Trace Elem Res*, 165, 183-193.
9. EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Scientific opinion on the safety and efficacy of DL-selenomethionine as a feed additive for all animal species. *EFSA J*, 12, 3567.
10. Surai PF., Fisinin VI., 2014. Selenium in poultry breeder nutrition: An update. *Anim Feed Sci Technol*, 191, 1-15.
11. Habibian M., Ghazi S., Moeini MM., Abdolmohammadi A., 2014. Effects of dietary selenium and vitamin E on immune response and biological blood parameters of broilers reared under thermoneutral or heat stress conditions. *Int J Biometeorol*, 58, 741-752.
12. Surai PF., Fisinin VI., Karadas F., 2016. Antioxidant systems in chick embryo development. Part 1. Vitamin E, carotenoids and selenium. *Anim Nutr*, 2, 1-11.
13. Canogulları S., Ayaşan T., Baylan M., Çopur G., 2010. The effect of organic and inorganic selenium supplementation on egg production parameters and egg selenium content of laying. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16, 743-749.
14. Rengaraj D., Hong Y., 2015. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *Int J Mol Sci*, 16, 9910-9921.
15. Fan C., Yu B., Chen D., 2009. Effects of different sources and levels of selenium on performance, thyroid function and antioxidant status in stressed broiler chickens. *Int J Poult Sci*, 8, 583-587.
16. Seven I., Seven PT., Yılmaz S., 2009. Responses of broilers under cold conditioning (15°C) to dietary triiodothyronine and iodine combined to antioxidants (Selenium and Vitamin C). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 499-504.
17. Urso UR., Dahlke F., Maiorka A., Bueno IJ., Schneider AF., Surek D., 2015. Vitamin E and selenium in broiler breeder diets: effect on live performance, hatching process, and chick quality. *Poult Sci*, 94, 976-983.
18. Rakha BA., Ansari MS., Hussain I., Malik MF., Akhter S., Blesbois E., 2015. Semen characteristics of the Indian Red Jungle Fowl (*Gallus gallus murghi*). *Eur J Wildl Res*, 61, 379-386.
19. Dhama K., Tiwari R., Khan RU., Chakraborty S., Gopi M., Karthik K., Saminathan M., Desingu PA., Sunkara LT., 2014. Growth promoters and novel

- feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: The trends and advances- A Review. *Int J Pharmacol*, 10, 129-159.
20. Panda AK., Cherian G., 2014. Role of vitamin E in counteracting oxidative stress in poultry. *J Poult Sci*, 51, 109-117.
21. Panda AK., Rama Rao SV., Raju MVLN., Shyam Sunder G., Reddy MR., 2009. Effect of higher concentration of vitamin E supplementation on growth performance, immune competence and antioxidant status in broilers. *Indian J Poult Sci*, 44, 187-190.
22. Rama Rao SV., Prakash B., Raju MVLN., Panda AK., Kumari RK., Pradeep Kumar Reddy E., 2016. Effect of supplementing organic forms of zinc, selenium and chromium on performance, anti-oxidant and immune responses in broiler chicken reared in tropical summer. *Biol Trace Elem Res*, 172, 511-520.
23. Asadi F., Shariatmadari F., Karimi-Torshizi MA., Mohiti-Asli M., Ghanaatparast-Rashti M., 2017. Comparison of different selenium sources and vitamin E in laying hen diet and their influences on Egg selenium and cholesterol content, quality and oxidative stability. *IJAS*, 7, 83-89.
24. Jing CL., Dong XF., Wang ZM., Liu S., Tong JM., 2015. Comparative study of DL-selenomethionine sodium selenite and seleno-yeast on antioxidant activity and selenium status in laying hens. *Poult Sci*, 94, 965-975.
25. Cosman F., 2008. Parathyroid hormone treatment for osteoporosis. *Curr Opin End Diab Obes*, 15, 495-501.
26. Hartman C., Wilhelmson M., 2001. The hens egg yolk a source of biologically active substances. *World's Poult Sci J*, 57, 13-28.
27. Leeson S., Caston LJ., 2003. Vitamin enrichment of eggs. *J Appl Poult Res*, 12, 24-26.
28. Bou R., Guardiola F., Barroeta AC., Codony R., 2005. Effect of dietary fat sources and zinc and selenium supplements on the composition and consumer acceptability of chicken meat. *Poult Sci*, 84, 1129-1140.
29. Dagdaş B., Yıldız AO., 2004. Effects of adding organic selenium and vitamin E e to broiler rations on performance, carcass characteristics and some tissues selenium concentrations of broilers. *J Agric Fac Süleyman Demirel Univ*, 18, 94-100.
30. Surai PF., 2000. Effect of the selenium and vitamin E content of the maternal diet on the antioxidant system of the yolk and the developing chick. *Br Poult Sci*, 41, 235-243.
31. Pan C., Huang K., Zhao Y., Qin S., Chen F., Hu Q., 2007. Effect of selenium source and level in hen's diet on tissue selenium deposition and egg selenium concentrations *J Agric Food Chem*, 55, 1027-1032.
32. Petrovic V., Boldizarova K., Faix S., Mellen M., Arpasova H., Leng L., 2006. Antioxidant and selenium status of laying hens fed with diets supplemented with selenite or Se-yeast. *J Anim Feed Sci*, 15, 435-444.
33. Sahin K., Sahin N., Sari M., Gursu MF., 2002. Effects of vitamin E and A supplementation on lipid peroxidation and concentration of some mineral in broilers reared under heat stress (32°C). *Nutrition Res*, 22, 723-731.
34. Sahin K., Sahin N., Yaralioglu S., 2002. Effects of vitamin C, and vitamin E on lipid peroxidation, blood serum mineral concentrations of laying hens reared at high ambient temperature. *Biol Trace Elem Resc*, 85, 35-45.
35. Sahin K., Sahin N., Yaralioglu S., Onderci M., 2002. Protective role of supplemental vitamin E and selenium on lipid peroxidation, vitamins E, A and mineral concentrations of Japanese quails reared under heat stress. *Biol Trace Elem Res*, 85, 59-70.
36. Ozcelik D., Dursun S., Kahraman Z., Kocabagli N., Alp M., 2001. Effect of dietary supplementation of copper at toxic level on performance and copper concentrations of some tissues in broilers. *J Fac Vet Med Univ Istanbul*, 27, 255-262
37. Skrivan M., Skrivan V., Marounek M., 2006. Effect of various copper supplements to feed of laying

- hens on Cu content in eggs, liver, excreta, soil, and herbage. *Arch Environ Contam Toxicol* 50, 280-283.
38. Skrivan M., Skrivan V., Marounek M., 2005. Effect of dietary zinc, iron and copper in layer feed on distribution of these elements in eggs, liver, excreta, soil and herbage. *Poult Sci*, 84, 1570-1575.
39. Spears JW., 2003. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr*, 133, 1506-1509.
40. Harsini SG., Habibiyan M., Moeini MM., Abdolmohammadi AR., 2012. Effects of dietary selenium, vitamin E and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biol Trace Elem Res*, 148, 322-330.
41. Kotyzova D., Cerna P., Leseticky L., Eyb V., 2010. Trace elements status in selenium-deficient rats- interaction with cadmium. *Biol Trace Elem Res*, 136, 287-293.
42. Pappas AC., Zoidis E., Georgiou CA., Demiris N., Surai PF., Fegeros K., 2011. Influence of organic selenium supplementation on the accumulation of toxic and essential trace elements involved in the antioxidant system of chicken. *Food Addit Contam*, 28, 446-454.
43. Nordberg GF., 2009. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Tox App Phar*, 238, 192-200.



Investigation of Seroprevalence of Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis in Sheep and Goats in Siirt Province

Özgür Yaşar ÇELİK¹, Gülşah AKGÜL¹, Kıvanç İRAK²

1. Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Siirt, TURKEY.
2. Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Siirt, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
01.11.2017	12.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Çelik Öy, Akgül G, Irak K: Investigation of Seroprevalence of Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis in Sheep and Goats in Siirt Province. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 274-273, 2018. DOI: 10.17094/ataunivbd.348533

Abstract: Maedi-visna (MV) and Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) are economically important viral diseases that infect sheep and goats. The aim of this study is to determine the seroprevalence of MVV and CAEV on sheep and goats raised in Siirt region by using the ELISA method. Blood samples were collected to non-anticoagulant tubes from the jugular veins of a population of 465 small ruminants consisting of 182 sheep and 283 goats selected from different districts of Siirt Province. The samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and the serum were transferred to Eppendorf tubes, which were stored at -20°C until further analysis. Commercial kits (IDEXX MVV / CAEV p28 Ab screening, IDEXX, USA) were used for the detection of Anti-MVV/CAEV antibodies. All samples were found to be seronegative in terms of Anti-MVV/CAEV antibodies. As a result of this study conducted in the Siirt province, MVV and CAEV infections were not detected in the studied population. Given that the infections exist with varying seroprevalence levels in different regions of Turkey, however, it might be worthwhile to investigate the infection status in Siirt province by including larger herds in future studies.

Keywords: Caprine arthritis encephalitis, ELISA, Maedi-visna, Sheep-Goat, Siirt.

Siirt İli Koyun ve Keçilerinde Maedi-Visna ve Caprine Arthritis Encephalitis Seroprevalansının Araştırılması

Öz: Maedi-visna (MV) ve Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) koyun ve keçileri etkileyen, önemli ekonomik kayıplara neden olan viral bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı Siirt ilinde yetiştirilen koyun ve keçilerde Maedi-visna ve Caprine Arthritis-Encephalitis seroprevalansının ELISA yöntemiyle belirlemektir. Çalışmanın materyalini Siirt ilinin farklı lokalitelerinde yetiştirilen 182 koyun ve 283 keçi olmak üzere toplam 465 küçük ruminant oluşturdu. Hayvanların vena jugularisinden anticoagulanız tüplere alınan kan örnekleri 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildikten sonra ependorf tüplerine aktarıldı ve analiz yapıncaya kadar -20 oC de muhafaza edildi. Anti-MVV/CAEV antikorlarının tespiti için ticari kit (IDEXX MVV / CAEV p28 Ab screening, IDEXX, USA) kullanıldı. Yapılan çalışma sonucunda tüm örneklerin Anti-MVV/CAEV antikorları yönünden seronegative olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda Siirt ili sınırları içerisinde MVV ve CAEV enfeksiyonuna rastlanılmamıştır. Ancak Türkiye'nin farklı yerlerinde değişen seroprevalanslarda enfeksiyonun varlığının bildirilmesi Siirt ilinde daha geniş sürüleri içine alacak şekilde hatalığın durumunun araştırılmasında fayda olacağını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Caprine arthritis encephalitis, ELISA, Koyun-Keçi, Maedi-visna, Siirt.

✉ Özgür Yaşar ÇELİK

Siirt University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Internal Medicine, Siirt, TURKEY.
e-mail: oyc@siirt.edu.tr

INTRODUCTION

Maedi-visna (MV) and Caprine Arthritis-Encephalitis (CAE) are economically important viral diseases that infect sheep and goats. While maedi-visna virus (MVV) is from the lentivirus genus of retroviridae family and infects sheep, caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) causes infection in goats. These diseases are formed by lentiviruses called Small Ruminant Lentiviruses (SRLV). The lentiviral diseases cause significant economic losses in sheep and goats raising animal husbandry establishments. MVV in sheep and CAEV in goats stay persistent throughout the lifetime despite the humoral and cellular immune response being present (1-4). Studies in recent years have classified SRLV group viruses in 5 genotypes, as A, B, C, D and E genotypes. Genotype A has been divided into sub types from A1 to A13 and it includes classic MVV and other SRLV variants. Genotype B (sub types are B1, B2, and B3) includes classic CAEV strains (3). It is reported that the disease can also be transmitted to other animals via milk and colostrum (5,6).

While in most animals the disease course is subclinical, incurable syndromes like dyspnea (maedi) or neurologic symptoms (visna) can be observed in some of them. The most significant symptoms of the disease are interstitial pneumonia, encephalitis, lymphadenopathy, arthritis, mastitis and chronic loss of weight (1,7-10).

While it was reported to have been observed in America first, in the following years CAEV was reported in France, Australia, Spain, Germany, England, Argentina, Iraq and Tunisia; while MVV was reported in Italy, China, Canada and Spain (10,11). Although no known effective medical treatment exists for the disease, supportive care and the use of antibiotics against secondary infection is recommended (3).

The aim of this study is to determine the seroprevalence of MVV and CAEV on sheep and goats raised in Siirt region by using the ELISA method.

MATERIALS and METHODS

Blood samples were collected to non-anticoagulant tubes from the jugular veins of a population of 465 small ruminants consisting of 182 sheep and 283 goats selected from different districts of Siirt province. The samples were centrifuged for 10 minutes at 3000 rpm and the sera were transferred to Eppendorf tubes, which were stored at -20 °C until further analysis. Commercial kits (IDEXX MVV / CAEV p28 Ab screening, IDEXX, USA) were used for the detection of Anti-MVV/CAEV antibodies.

The study was carried out with the ELISA method and in accordance with the suggestions of the producer company. The plates were measured at 450 nm to obtaining the optical density (OD) data, and the derived results were calculated in accordance with the procedures.

Ethical Approval

Ethical approval for this study was obtained from the Siirt University Local Ethics Committee for Animal Experiments. (Approval Number: 2017-21)

RESULTS

In order to determine the MVV and CAEV seroprevalence at sheep and goats in Siirt region, 465 small ruminants consisting of 182 sheep and 283 goats were examined with ELISA method, all of which were found to be seronegative in terms of Anti-MVV/CAEV antibodies.

DISCUSSION and CONCLUSION

MV and CAE have varying seroprevalence levels in different areas of the world, and it maybe possible to diagnose them based on the available clinical, pathological, and histopathological findings. Today, however, there are serological methods used that could reveal the presence of sub-clinical diseases, such as serum neutralization (SN), Agar Gel Immunodiffusion (AGID) and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tests (12,13).

Across the world, the seropositivity for disease is reported as 82% in Australia (6), 36.5% in Brazil (14), 73% in America (15), 4.3% in England (6), 49.5% Norway (16), 2% in Switzerland (17).

A study conducted on sheep and goats raised in Şanlıurfa region of Turkey (11), reports that CAEV seroprevalence was 6%, while MVV seroprevalence is 10%. In a study (18) conducted in Adana on Saanen goats, CAEV seroprevalence was reported as 2.66%. In another study in the same region (19), the seroprevalence of CAEV infection was reported to be 6.8%. There is also a study (20) that was carried out in eight provinces of Turkey, in which the researchers report that MVV seroprevalence was 2.6%. A study conducted in the Konya province reports MVV seroprevalence as 2.9% (13).

One noteworthy study in terms of the similarity of the results to our study is the one conducted in the Hatay region (21), in which the researchers report that they did not find out any seropositivity for MVV, while they determined CAEV seroprevalence as 1.03% (22). In another research (23) carried out in the vicinity of Afyonkarahisar province, the researchers found the MVV seroprevalence as 5.7%, while another study (24) in Kırıkkale, reports MVV and CAEV seroprevalences as 7.5% and 19.4% respectively. In the study that carried out on goats in different region of turkey, CAEV seroprevalence was stated as 1.9% (25).

As a result of this study conducted in the Siirt province, MVV and CAEV infections were not detected in the studied population. Given that infections exist with varying seroprevalence levels in different regions of Turkey, However, it might be worthwhile to investigate the infection status in Siirt province by including larger herds in future studies.

REFERENCES

- Pepin M., Vitu C., Russo P., Mornex JF., Peterhans E., 1998. Maedi-Visna virus infection in sheep: A review. *Vet Res*, 29, 341-367.
- Phelps S., Smith M., 1993. Caprine arthritis-encephalitis virus infection. *J Am Vet Med Assoc*, 203, 1663-1666.
- Spickler A., 2015. Small Ruminant Lentiviruses: Maedi-Visna & caprine arthritis and encephalitis. The Center for Food Security & Public Health Iowa State University, 1-8.
- Timurkan M., Sozdutalmaz I., Aydın H., Kırbaş A., Aktaş M., Özkanlar Y., 2014. Serological and virological investigation of Maedi Visna and Caprine arthritis encephalitis virus infections in sheep and goats in Erzurum Province Turkey. In International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance, Vienna, Austria.
- Al-Ani F., Vestweber J., 1984. Caprine arthritis-encephalitis syndrome (CAE): A Review. *Vet Res Commun*, 8, 243-253.
- Dawson M., Wilesmith J., 1985. Serological survey of lentivirus (maedi-visna/caprine arthritis-encephalitis) infection in British goat herds. *Vet Rec*, 117, 86-89.
- Cutlip RC., Lehmkuhl HD., Schmerr MJF., Brogden KA., 1988. Ovine progressive pneumonia (maedi-visna) in sheep. *Vet Microbiol*, 17, 237-250.
- Grewal A., Burton R., Smith J., Batty E., Greenwood P., North R., 1986. Caprine retrovirus infection in New South Wales: Virus isolations, clinical and histopathological findings and prevalence of antibody. *Aust Vet J*, 63, 245-248.
- Rowe JD., 2006. Control programmes for chronic goat diseases. *Proceedings of The North American Veterinary Conference*, Orlando, Florida, 290-293.
- Hamza LA., Özkan C., 2017. Serological investigation of Maedi-Visna in sheep with chronic respiratory disease in Erbil, Iraq. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12, 227-234.
- Çimtay İ., Kesikin O., Şahin T., 2004. Şanlıurfa yöresinde koyun ve keçilerde bazı lentivirus enfeksiyonlarının araştırılması. *Uludağ Uni J Fac Vet Med*, 23, 33-38.
- Alibaşoğlu M., Arda M., 1975. Koyun pulmoner adenomatozisi'nin Türkiye'de durumu ile patolojisi ve etiolojisinin araştırılması. *TÜBİTAK VHAG Yayınları*, 274.
- Yavru S., Şimşek A., Bulut O., Kale M., 2012. Konya bölgesi koyunlarında Maedi-Visna virus enfeksiyonu üzerine serolojik araştırma. *Eurasian J Vet Sci*, 28,142-148.

14. Garcia M., Galhardo M., Araujo W., D'Angelino J., Bastos P., Rossini A., 1992. Caprine arthritis-encephalitis (CAE). Occurrence of positive sera in goats raised in Brazil. *Trop Anim Health Prod*, 24, 164-164.
15. Cutlip R., Lehmkuhl H., Sacks J., Weaver A., 1992. Prevalence of antibody to caprine arthritis-encephalitis virus in goats in The United States. *J Am Vet Med Assoc*, 200, 802-805.
16. Nord K., Rimstad E., Storset AK., Loken T., 1998. Prevalence of antibodies against caprine arthritis-encephalitis virus in goat herds in Norway. *Small Rumin Res*, 28, 115-121.
17. Krieg A., Peterhans E., 1990. Caprine arthritis-encephalitis in Switzerland: Epidemiologic and clinical studies. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 132, 345-352.
18. Yapıcı O., Avcı O., Dik I., Atlı K., Yavru S., 2013. Saanen keçilerinde caprine arthritis-encephalitis virus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. *AVKAE Derg*, 3, 51-54.
19. Özkan VC., Acar A., Gür S., 2014. Kronik solunum sistemi problemleri olan keçi sürülerinde caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) enfeksiyonunun rolünün araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 7, 9-16.
20. Karaoğlu T., Alkan F., Burgu İ., 2003. Küçük aile işletmelerindeki koyunlarda Maedi-Visna enfeksiyonunun seroprevalansı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 50, 123-126.
21. Aslantaş Ö., Pinar D., Güngör B., 2002. Hatay yöresinde Maedi-Visna enfeksiyonunun serolojik olarak araştırılması. *Vet Hek Mikrob Derg*, 2, 37-42.
22. Aslantas O., Ozyoruk F., Pinar D., Gungor B., 2005. Serological survey for caprine arthritis-encephalitis virus in DAMASCUS and Kilis goats in Hatay, Turkey. *Rev Med Vet*, 156, 402-404.
23. Arık C., Acar A., Gür S., 2015. Afyonkarahisar İli ve çevresinde Maedi-Visna virus enfeksiyonunun klinik ve serolojik olarak araştırılması. *Kocatepe Vet J*, 8, 39-44.
24. Azkur A., Gazyagci S., Aslan M., 2011. Serological and epidemiological investigation of Bluetongue, Maedi-Visna and Caprine arthritis-encephalitis viruses in small ruminant in Kirikkale district in Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 803-808.
25. Burgu I., Akca Y., Alkan F., Ozkul A., Karaoğlu T., Cabalar M., 1994. Antibody prevalence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) in goats in Turkey. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 101, 390-391.



Van İli ve Bazı İlçelerinde Koyunlarda *Fasciola hepatica*'nın Seroprevalansı*

Vural DENİZHAN¹✉, Kamile BİÇEK²

1. Van, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.
2. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Van, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.01.2017	22.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Denizhan V, Biçek K: Van İli ve Bazı İlçelerinde Koyunlarda *Fasciola hepatica*'nın Seroprevalansı. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 278-284, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.500867

Öz: Bu çalışma, Van merkez ile Özalp, Saray, Gevaş ve Gürpınar ilçelerinde koyunlarda *Fasciola hepatica* tarafından oluşturulan fasciolosis'in yayılışını tespit etmek amacıyla Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında <2 yaş grubu 110, 2-6 yaş grubu 171 ve > 6 yaş grubu 71 olmak üzere toplam 352 koyun üzerinde yürütülmüştür. Alınan her dışkı ve kan örneği, Benedek sedimentasyon ve antikor ELISA yöntemleri ile sırasıyla parazitin yumurtaları ve spesifik antikorlar yönünden incelenmiştir. Örnek alınan koyunların bulunduğu bölge, numune alma tarihi, hayvanların yaşı ve cinsiyeti kaydedilmiştir. Araştırma bölgelerinde koyunlarda *Fasciola hepatica*'nın dışkı bakısına göre prevalansı %15.63, seroprevalansı ise %49.43 olarak saptanmıştır. Enfekte hayvanlarda Benedek sedimentasyon ile dışkıda *Fasciola hepatica*'nın yumurtaları bulunmuştur. Fasciolosis seroprevalansı en yüksek (% 83.09) >6 yaş grubunda görülmüş, bunu %46.19 ile 2-6 yaş grubu ve %36.32 ile <2 yaş grubu izlemiştir. Yaş grupları arasındaki farklılık önemli bulunmuştur (P<0.001 Chi-Square testine göre). Dişi Koyunlarda fasciolosis'in seroprevalansı %50.35, erkek koyunlarda ise %45.71 olarak belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (P>0.001). Sonuç olarak *Fasciola hepatica* Van ilindeki koyunlarında tespit edilmiştir. Bu paraziter enfeksiyonun bölgedeki epidemiyolojisi ve kontrolü için daha da ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: ELISA, Fasciolosis, Van, Prevalans, Koyun.

Seroprevalence of *Fasciola hepatica* in Sheep in the Province of Van and Some Districts

Abstract: This study was carried out on 352 sheep 110 of which is below the age of 2, 171 is between 2-6 and 71 is above the age of 6 to determine the prevalence of fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* in sheep in the centre of Van and its districts Özalp, Saray, Gevaş and Gürpınar between January and December 2009. All feces and blood samples were examined in the point of the eggs of parasite in feces and specific antibodies, respectively by Benedek sedimentation and antibody ELISA techniques. The origin of sheep, date of sample collection, age and sex of the sheep were recorded. In the research areas, the coprological prevalence and seroprevalence of fasciolosis in sheep were determined as 15.63 % and 49.43%, respectively. In the infected sheep, *Fasciola hepatica* were found by benedek sedimentation. The highest prevalence seroprevalence of Fasciolosis was observed among the sheep above age of 6 (83.9 %) and followed by 2-6 age group (46.19%) and <2 age group of sheep (36.32%). In the point of statistics, the difference between the age groups was significant (According to Chi-Square testing P<0.001). The seroprevalence of fasciolosis was %50.35 among females and %45.71 among males which was not accepted as a remarkable difference (P>0.001). As a result *Fasciola hepatica* was commonly detected in sheep in Van province. Epidemiology and control of this parasitic infections in the region for further studies are needed.

Keywords: ELISA, Fasciolosis, Van, Prevalence, Sheep.

✉Vural DENİZHAN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Özalp Meslek Yüksekokulu, Van, TÜRKİYE.
e-posta: vdenizhan@yyu.edu.tr

*Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde yürütülmüş olan aynı başlıklı doktora tezinden üretilmiştir.

GİRİŞ

Fasciolosis tüm dünyada özellikle hayvancılığın yaygın olduğu ülkelerde halen oldukça sık görülen paraziter bir hastalıktır. Her ne kadar koyun ve sığırların hastalığı olarak tanımlanmakta ise de insanlarda da sık olarak görülmekte ve hiperendemik olduğu bölgeler bulunmakta olduğu bildirilmektedir (1,2,3,4).

Türkiye, gerek iklimsel gerekse ekolojik faktörler yönünden *Fasciola* türlerinin yayılışı için uygun bir ülke olarak gözükmektedir. Türkiye’de şimdiye kadar *Fasciola* türlerinden yalnızca *F. hepatica* ve *F. gigantica*’nın varlığı bildirilmiştir (5,6,7). Van da koyun, keçi ve sığırlarda yapılan bir çalışmada, koyunlarda *F. hepatica* %78.7, *F. gigantica* %14.5, *D. dendriticum* %80, keçilerde *F. hepatica* %62.8, *F. gigantica* %4.1, *D. dendriticum* %85, sığırlarda ise *F. hepatica* %40.1, *F. gigantica* %6.6, *D. dendriticum* %80.6 oranlarında tespit edilmiştir (8). Van Belediye mezbahanesinde kesilen 345 koyun, 115 keçi ve 145 sığır karaciğeri üzerinde *F. gigantica*’nın yayılışı araştırılmış, koyunların %15.6’sında, keçilerin %18.2’sinde, sığırların %25.2’sinde bu parazit tespit edilmiştir (9).

Fasciolosis’in teşhisi rutin olarak sedimentasyon yöntemi kullanılarak dışkıda parazitin yumurtalarının görülmesi ile yapılmaktadır. Ancak bu durumda parazitlerin ergin dönemde olmadığı veya hastalığın latent seyrettiği dönemlerde teşhis imkanını zorlaştırdığı bilinmektedir. Bunun için son yıllarda bu enfeksiyonları teşhis edebilmek için rutin parazitolojik yöntemlerle birlikte serolojik yöntemlerde kullanılmaya başlamıştır. Bu yöntemlerden özellikle ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), parazitin erken dönemlerde belirlenmesi, daha pratik ve sürü taramalarında kolaylıkla uygulanabilir olması sebebiyle, günümüzde daha çok tercih edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı ELISA ve Benedek sedimentasyon tekniği ile Van ve yöresini koyunlarında fasciolosis’in prevalansını tespit

edilerek, hastalık hakkında epidemiyolojik verilerin elde edilmesi, fasciolosis’in erken teşhisi ve kontrolünde önemli noktaları belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Materyal Alınan Odaklar

Bu çalışma Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında Van merkez ile Özalp, Saray, Gevaş ve Gürpınar (Özalp Merkez, Özalp Tepedam, Özalp Kırçal, Özalp Sağmal, Özalp Şemsettin, Van Merkez E.B.K, Saray Beyaslan, Saray Çayırbağı, Saray Değirmigöl, Gevaş Merkez, Gürpınar Merkez ve Gürpınar Elaçmaz) ilçelerinde yürütülmüştür. Bu çalışma için kışları ahırda yazları merada beslenen tamamı meraya çıkmış, rast gele usulle seçilen, toplam 352 koyun çalışmanın materyalini oluşturmuştur.

Dışkı Örneklerinin Toplanması

Koyunlarda dışkı alımından önce hayvan sahibi veya bakıcıları tarafından zaptırap altına alındıktan sonra her bir hayvanın rektumundan yaklaşık 30-50 gr dışkı, dışkı poşetlerine alınmıştır. Poşetler pedigrı bilgilerine göre numaralandırılarak üzerlerine ayrıca dışkı alma tarihleri yazılmıştır. Alınan örnekler laboratuara getirilerek incelenene kadar 4°C’de muhafaza edilmiştir.

Kan Örnekleri Toplanması

Dışkı örneği alınan her bir hayvanın *V. jugularis*’inden 5 ml kan steril serum tüplerine alınmıştır. Kayıt numarası verilen kan örnekleri laboratuara getirildikten sonra tekniğine uygun olarak serumları çıkarılmış ve ependorf tüplere aktarılmıştır. Serum örnekleri incelenene kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

Dışkı Örneklerinin Muayenesi

Dışkı örneklerinin incelenmesinde, Benedek sedimentasyon yöntemi kullanılmıştır.

Serum Örneklerinin İncelenmesi

Serum örnekleri; ekskresyon-sekresyon (E/S) antijenlerine karşı spesifik antikolar yönünden *Fasciola hepatica* IgG ELISA kiti (EIA-4503) ile *Fasciola hepatica*'nın spesifik antikolarının varlığı yönünden incelenmiştir. Mikropleytlar, test prosedüründen

sonra ELISA okuyucuya (Bio-Tek Instruments, MicroQuant micropleyt reader) yerleştirildi ve 450 nm dalga boyunda okutulmuştur. Elde edilen optik dansite değerleri üretici firmanın açıklamalarına göre formülize edildi (QC data sheet) ve elde edilen değerler üretici firmanın açıklamalarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 1. Elde edilen Anticor titre değerleri üretici firmanın açıklamalarına göre aşağı değerlendirilmiştir.

Table 1. The obtained Anticor titre values were evaluated according to the company's explanations.

0	+	++	+++	++++
Değer< 11	<Değer< 11-32	<Değer< 32-45	<Değer< 45-61	<Değer< 61

(*Fasciola hepatica* IgG ELISA. DRG Instruments GmbH, Germany Division of DRG International. Inc Frauenbergstr. 18, D-35039 Marburg).

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel açıdan koyunlarda fasciolosis'in yayılışında yaş, cinsiyet ve bölgenin χ^2 : Chi-Square ve Z testleri kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Van merkez ve yöresini temsilen fasciolosis yönünden incelemesi yapılan koyunların yaş, cinsiyet ve yerleşim alanlarına Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Van ve yöresini temsilen muayene edilen koyunların yerleşim yerine, yaşına ve cinsiyetine göre dağılımı.

Table 2. The distribution of the sheeps which are examined as representing Van and region according to settlement place, age and sex.

Yerleşim yeri	Bakısı yapılan koyun sayısı					Toplam
	Yaş (yıl)			Cinsiyet		
	<2	2-6	>6	Dişi	Erkek	
Gürpınar Merkez	8	10	5	17	6	23
Gürpınar Elaçmaz	6	9	8	20	3	23
Özalp Merkez	7	15	6	22	6	28
Özalp Kırçalı	12	14	4	23	7	30
Özalp Sağmal	11	21	5	28	9	37
Özalp Şemsettin	10	19	4	25	8	33
Özalp Tepedam	10	13	8	24	7	31
Gevaş Merkez	6	17	5	23	6	29
Van Merkez EBK	6	12	8	21	5	26
Saray Beyaslan	14	12	8	29	5	34
Saray Çayırbağı	11	17	3	27	4	31
Saray Değirmigöl	9	12	7	23	4	27
Toplam	110	171	71	282	70	352

Fasciola hepatica ile enfekte koyunlarda saptanan antikor titrelerinin dağılımı Tablo 3'de görüldüğü gibi "+" düzeyinde 82 koyun "++"

düzeyinde 59, "+++" düzeyinde 25 ve "++++" düzeyinde 8 koyun izlenmiştir.

Tablo 3. Fasciolosis'in antikor titrelerine göre seroprevalansı.

Table 3. Seroprevalence according to antibody titers of fasciolosis.

Antikor Titresi	İncelenen Koyun	
	Sayısı	%'si
0	178	50.57
+	82	23,30
++	59	16.76
+++	25	7.10
++++	8	2.27
Toplam	352	100

Van ve yöresinde incelemesi yapılan toplam 352'i koyundan 174 (%49.43) 'ü serolojik olarak *F. hepatica* antikorunu yönünden ve 55'inde (%15.63) 'sinde ise Benedek sedimentasyon dışkı bakı yöntemi

ile *Fasciola spp.* yumurtaları yönünden pozitif bulunmuştur. Fasciolosis'in araştırma bölgelerindeki koyunlarda, ELISA ve dışkı bakışı yöntemlerine göre dağılımı Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. ELISA ve gaita muayenesine göre fasciolosis'in yayılışı.

Table 4. Distribution of fasciolosis according to ELISA and gaita examination.

Yerleşim Yeri	ELISA				Dışkı muayenesi (Benedek Sedimentasyon yöntemi)	
	İncelenen koyun		Pozitif koyun		Pozitif koyun	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Gürpınar Merkez	23	6.53	7	30.43	3	13.04
Gürpınar Elaçmaz	23	6.53	10	43.48	4	17.40
Özalp Merkez	28	7.95	10	35.71	0	0
Özalp Kırçalı	30	8.52	19	63.33	9	30.00
Özalp Sağmalı	37	10.51	21	56.76	6	16.21
Özalp Şemsettin	33	9.38	19	57.57	7	21.21
Özalp Tepedam	31	8.81	12	38.70	0	0
Gevaş Merkez	29	8.24	16	55.17	3	10.34
Van Merkez EBK	26	7.39	15	57.69	6	23.07
Saray Beyaslan	34	9.66	20	58.82	11	32.35
Saray Çayırbağı	31	8.81	15	48.37	6	19.35
Saray Değirmigöl	27	7.67	10	37.04	0	0
Toplam	352	100	174	49.43	55	15.63

Çalışmada incelenen 352 koyundan 174'ünde ELISA yöntemi ile *Fasciola hepatica* antikorunu tespit edilmiştir. Bu hayvanlarda fasciolosis'in yayılışına yaşın etkisi incelendiğinde; en yüksek prevalansın %83.09 >6 yaş grubunda görüldüğü, bunu %46.19 ile

2-6 yaş gurubu ve %32.2 ile <2 yaş grubu izlenmiştir. Yaş grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0.001). Yaş grupları arasındaki farklılıklar Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Koyunlarda *Fasciola spp.* enfeksiyonlarıyla yaş grupları arasındaki ilişkiler.
Table 5. *Fasciola spp.* Relationships between infections and age groups.

Yaş grupları(yıl)	İncelenen Koyun sayısı	Seropozitif koyun		χ^2	P
		Sayısı	%		
<2	110	36	32.72	45.1886	0.001
2-6	171	79	46.19	48.2590	0.001
>6	71	59	83.09	3.88463	0.001
Toplam	352	174	49.43		

χ^2 : Chi-Square testi uygulanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Fasciolosis; koyun, keçi, sığır, manda ve deve başta olmak üzere çeşitli evcil ve yabani ruminantlar ile at, eşek, domuz, tavşan, fil, köpek, kedi gibi hayvanlarda ve insanlarda görülmektedir. (4,10,11).

Ülkemiz, iklimsel ve ekolojik faktörler yönünden *Fasciola* türlerinin yayılışı için uygun bir ortam olarak görülmektedir. Kayseri yöresinde sığırlarda fasciolosis'in seroprevalansı ELISA ile %69.2 olarak bildirilmiştir (3). Koyunlarda gaita muayenesi ile *Fasciola hepatica*'ya İstanbul'da %6 (12), Samsun ve Ordu'da %18.1-30.2 (13,14), Konya'da %12.9 (15), Elazığ'da %16.1 (16), Van'da %0.3-15.9 (7), Trakya bölgesinde %3.9-95 (6), Kırıkkale'de %0.6 (17), Şanlıurfa'da %1.9 (18), sığırlarda ise Samsun ve Ordu'da %0.5-15.4 oranlarında bulunduğu bildirilmiştir. (13,14). Van ve yöresinde *Fasciola gigantica*'dan ileri gelen fasciolosis'in gaita muayenesine göre koyunlarda %33-15.9 olduğu bildirilmiştir (7).

Bu çalışma, Van yöresinde fasciolosis üzerine yapılmış ilk serolojik saha araştırmasıdır. Bu çalışma ile Van yöresinde koyunlarda fasciolosis yaygınlığının ELISA ile %49.43 Benedek Sedimentasyon tekniği ile %15.63 olduğu ortaya konmuştur. Van yöresinde saptanan fasciolosis seropozitifliği Elazığ (16) ve Kayseri (4) yöreleri ile karşılaştırıldığında, sonuçların birbirilerine yakın çıktığı belirlenmiştir. Gaita muayenesi ile saptanan pozitiflik Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden bildirilenler ile paralellik göstermektedir.

Bu çalışmada, koyunlarda fasciolosis'in saptanması amacıyla *F. hepatica*'nın serumda IgG antikorlarını saptamaya yönelik ELISA testi

kullanılmıştır. Araştırmamızda fasciolosis'in prevalansı ELISA yönteminde dış muayenesine göre daha yüksek çıkmıştır. Seroprevalansın yüksek bulunmasının araştırmacıların (19,20) belirttiği gibi, latent dönemdeki enfeksiyonlardan, vücuda alınan ve olgunlaşamayan parazitlerden ve tedavi görmüş hayvanlarda kaynaklanabileceği söylenmektedir. Çalışmamızda da antikor titrelere bakıldığında serolojik olarak pozitif çıkan hayvanların önemli bir kısmında (%23.30) düşük düzeyde (+) antikor titresi saptanması bu görüşü desteklenmektedir. Antikor titrelere bu düzeyde çıkması, Van yöresinin fasciolosis'in yayılışı için uygun bir ekosisteme sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle Van ve yöresinde fasciolosis'in teşhisinde dışkı muayenesinin yanında özellikle sensitivite ve spesifitesi daha yüksek olan serolojik testlerin uygulanması ve daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Yaşın fasciolosis enfeksiyonlarının değişkenlik göstermesinde önemli bir faktördür. (3,21,22). Genelde yaşın artması ile orantılı olarak enfeksiyon oranının artış gösterdiği, özellikle 2 yaş üzeri olan koyunlarda daha yaygın (%18.5-55.7) olduğuna dikkat çekilmektedir (22). Bu çalışmada koyunların yaş gruplarına göre en yüksek prevalans >6 yaş grubunda % 83.09 saptanmış bunu %46.19 ile 2-6 ve %32.72 ile <2 yaş grupları izlemiştir. Yaş grupları arasında fasciolosis'in yaygınlığı istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar bazı araştırmacıların (23) bulgularıyla paralellik göstermektedir.

Bu çalışma ile Van ve yöresi koyunlarda fasciolosis'in oldukça yaygın bir paraziter enfeksiyon olduğu ortaya konmuştur. Özellikle latent enfeksiyonlar göz önüne alındığında dışkı bakışı

yöntemlerinin fasciolosis'in teşhisinde yetersiz kalabileceği, sürü muayenelerinde ve saha çalışmalarında dışkı muayenesinin yanında serolojik testlerin de kullanılmasının daha avantajlı ve doğru olacağı kanaatine varılmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada elde edilen bulgular; sadece klinik ve mikroskopik metotlara dayanarak koyunlarda fasciolosis'in prevalansını saptanması doğru olmayacağını ortaya konmuştur. Bu konuda klinik ve mikroskopik metotlarla birlikte serolojik ve moleküler teşhis metotlarının da kullanılmasının gerekliliği ortaya çıkmıştır.

KAYNAKLAR

- Adıyaman F., 2007. Van ve yöresinde fascioliasis. YYÜ Sağlık Bil Enst, Yüksek Lisans Tezi.
- Maqbool A., 2002. Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. *Veterinar Ski Arhiv*, 72, 221-228.
- Yavuz A., 2006. Sığırlarda *Fasciola hepatica*'nın serorpevalansı. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Tınar R., Korkmaz M., 2003. Fasciolosis. *Türkiye Parazitoloji Derneği, Yayın No:18*, 1, baskı, İzmir, Türkiye.
- Akyol VÇ., 2001. Bursa ortak girişim tesislerinde (Etba) kesilen koyunlarda Distomatosis'in yayılışı. *J Fac Vet Med*, 20, 23-27.
- Gargılı A., Tüzer E., Gülanber A., Toparlak M., Efil İ., Keleş V., Ulutaş M., 1999. Trakya'da kesilen koyun ve sığırlarda karaciğer trematod enfeksiyonlarının yaygınlığı. *Türk J Vet Anim Sci*, 23, 2, 115-116.
- Toparlak M., Gül Y., 1988. Van İli belediye mezbahasında kesilen koyunlarda karaciğer trematod enfeksiyonları üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 35, 269-274.
- Taş Z., 1997. Van Mezbahasında kesilen hayvanlarda paraziter fauna tespit çalışmaları. YYÜ Sağlık Bil. Enst, Yüksek Lisans Tezi.
- Değer S., Akgül Y., Ağaoğlu ZT., Taşçı S., 1992. Van ve yöresinde *Fasciola gigantica*'dan ileri gelen fascioliasis enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve ekolojisi üzerine araştırmalar. *YYÜ Vet Fak Derg*, 3, 133-140.
- Andreas LC., Yan F., Theo DW., Grace M., 2015. Standardisation of egg-viability assays for *Fasciola hepatica* and *Calicophoron daubneyi*: A tool for evaluating new technologies of parasite control. *Veterinary Parasitology* 210, 25–31
- Elliot TP., Kelley JM., Rawlin G., Spithill TW., 2015. High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippsland, Victoria, Australia. *Vet. Parasitol.* 209, 117–124.
- Vuruşaner C., Çetin B., Akaya H., Gökçe R., 1998. İstanbul'da kesilen koyunlardaki karaciğer kelebekleri üzerine bir araştırma. *Türkiye Parazitol Derg*, 22, 432-437.
- Celep A., 1987. Samsun yöresi kuzu toklularda paraziter fauna tespiti ile kontrol ve tedavi gruplarında aylık ortalama ağırlık artışlarının belirlenmesine dair araştırmalar. *Türk Vet Hek Dern Derg*, 57, 69-79.
- Celep A., Açıcı M., Çetindağ M., Coşkun ŞZ., Gürsoy S., 1990. Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik araştırmalar. *Etilik Vet Mikrobiyol Derg*, 6, 117-130.
- Cantoray R., Aytekin H., Güçlü F., 1992. Konya yöresindeki keçilerde helmintolojik araştırmalar. *Veterinarium*, 3, 27-30.
- Özer E., Özcan C., Arslan N., Kalender H., Angın M., 1996. Elazığ Et ve Balık Kurumunda atılan koyun karaciğerlerinde bakteriyel ve paraziter etkenlerle bunların oluşturduğu ekonomik kayıplar. *Türk J Vet Anim Sel*, 20, 191-201.
- Aydenizöz M., Yıldız K., 2002. Kırıkkale'de kesilen koyunlarda karaciğer trematodlarının yaygınlığı. *Türkiye Parazitol Derg*, 3, 317-319.
- Altaş MG., Sevgili M., Gökçen A., İriadam M., 2003. Şanlıurfa'da kesilen koyunlarda karaciğer trematodlarının yaygınlığı. *Türkiye Parazitol Derg*, 27, 195-198.
- Charlier J., Vercruyse J., Morgan E., Dijk J., Williams DJ., 2014. Recent advances in the diagnosis, impact on production and prediction of *Fasciola hepatica* in cattle. *Parasitology*. 141, 326–335.
- Rondelaud D., Titi A., Vignoles P., Mekroud A.,

- Dreyfuss G., 2014. Adaptation of *Lymnaea fuscus* and *Radix balthica* to *Fasciola hepatica* through the experimental infection of several successive snail generations. *Parasit Vectors* 7, 296.
21. Phiri AM., 2005. Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with emphasis on age sex and origin. *J Vet Med*, 52, 414-416.
22. Munitaa MP., Rea R., Bloemhoff Y., Byrnea N., Martinez-Ibeas AM., Sayers RG., 2016 Six-year longitudinal study of *Fasciola hepatica* bulk milk antibody ELISA in the dairy dense region of the Republic Ireland. *Preventive Veterinary Medicine*. 134,16–25.
23. Conceiçao MAP., Durao RMB., Costa IMH., Castro A., Louza AC., Costa, JC., 2004. Herd-level seroprevalence of fasciolosis in cattle in north central Portugal. *Vet Parasitol*, 123,93-103.



Kanatlı Kesimi Aşamalarında *E. Coli* O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi*

Ahmet GEÇER¹, Nurhan ERTAŞ ONMAZ¹✉

1. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.11.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Geçer A, Ertaş Onmaz N: Kanatlı Kesimi Aşamalarında *E. Coli* O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 285-292, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.356910

Öz: Bu çalışma, Samsun ilinde kanatlı kesim aşamalarından toplanan farklı örneklerde *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7 prevalansını araştırmak ve virülans genlerini (*stx1* ve *stx2*, *eaeA* ve *ehlyA*) belirlemek amacıyla yapıldı. Bu amaçla, 40 iç organ, 40 bağırsak içeriği, 20 haşlama tank suyu ve kanatlı kesimhanesinin farklı birimlerinden (tüy yolma makinesi, kesme tahtası, iç organ çıkarma ünitesi ve personel eli ve 40 broiler karkas örneği) alınan 100 swap örneği analiz edildi. Tüm örnekler, novobiosin içeren selektif modifiye Tryptic Soy Broth (mTSB+N)'da ön zenginleştirmenin ardından immünomanyetik seperasyon (IMS) ve Cefixim – Tellurite'li CHROM agar'a ekilmesi yoluyla *E. coli* O157: H7 açısından analiz edildi. Şüpheli koloniler O157 ve H7 antiserumları ile incelendi. *rfbO₁₅₇*, *fliC_{H7}*, *stx1*, *stx2*, *eaeA* ve *ehlyA* genlerinin varlığı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile belirlendi. Çalışmada, 2 (%1) bağırsak içeriği örneğinden *E. coli* O157 identifiye edilmesine karşın, H7 tespit edilemedi. Her iki izolata da *stx1*, *stx2*, *eaeA* ve *ehlyA* geni içerdiği tespit edildi. Bu çalışma sonucunda, broiler bağırsak içeriğinde düşük oranda tespit edilen *E. coli* O157: H7 izolatların hepsinin anılan toksin genlerini içermesinden dolayı insan sağlığı için önemli bir tehlike oluşturabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Broiler, *Escherichia coli* O157: H7, Kesimhane, Kontaminasyon.

Investigation of *Escherichia coli* O157:H7 By IMS-PCR Techniques in Poultry Slaughtering Stages

Abstract: The present study was conducted to investigate the prevalence of *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 and to determine its virulence genes (*stx1* and *stx2*, *eaeA* and *ehlyA*) in different samples collected from a poultry cutting stages in Samsun province, Turkey. For this purpose, 40 viscera, 40 intestinal content, 20 scalding tank water and 100 swap samples taken from various poultry processing units (plucking machine, cutting board, removing unit of intestinal organs and personnel hands and broiler carcass) were analysed. All samples were analyzed for the isolation of *E. coli* O157:H7 through pre-enrichment in modified tryptone soy broth supplemented with novobiocin (mTSB+N) followed by immunomagnetic separation (IMS) and selective plating on CHROM agar with Cefixim – Tellurite. Presumptive *E. coli* O157:H7 isolates were tested with anti-O157 and H7 antisera. Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed on isolates for the detection of *rfbO₁₅₇*, *fliC_{H7}*, *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *ehlyA* genes. In this study, two intestinal content (1%) isolates were identified as *E. coli* O157 while were found negative for H7. Both isolates contained *stx1*, *stx2*, *eaeA* and *ehlyA* genes. As a result of this study, it was concluded that *E. coli* O157 isolates detected at low levels in the broiler intestinal contents might constitute a significant hazard for human health due to the presence of toxin genes.

Keywords: Broiler, Contamination, *Escherichia coli* O157:H7, Slaughterhouse.

✉ Nurhan ERTAŞ ONMAZ

Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni, Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.

e-posta: nertas@erciyes.edu.tr

*Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL- TYL-2015-5810 kodlu proje ile desteklenen Yüksek Lisans tezinden özetlenmiştir.

GİRİŞ

İnsan beslenmesinde önemli bir yeri olan kanatlı eti, besinsel kompozisyonu nedeniyle patojen ve apatojen mikroorganizmaların üremesi için oldukça uygun bir ortam oluşturmaktadır. Tavuk etlerine bulaşan patojen mikroorganizmalar ve/veya toksinleri, bu ürünlerin tüketilmesi ile insanlara geçebilmekte ve çeşitli enfeksiyonlara veya intoksikasyonlara neden olabilmektedir (1,2).

Escherichia coli (*E. coli*), kanatlılarda enfeksiyonlara neden olan etkenler arasında en çok izole edilenlerden biridir. Kanatlılardan genellikle, sadece kuşlar için patojen olan ancak insanlar için olmayan Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) suşunun izole edildiği bildirilmiştir (3,4). Kanatlıların insanlarda önemli enfeksiyonlara neden olan *E. coli* O157:H7 serotipine de oldukça duyarlı oldukları belirtilmektedir. Etken, kanatlıların kesimhanelere uygun olmayan koşullarda taşınması, yanlış kesim teknikleri, haşlama, tüy yolma ve soğutma aşamalarında meydana gelen çapraz kontaminasyonlarla karkas yüzeyinin tamamına yayılabilir (5,6). Bunların dışında kesimhanedeki alet ve ekipman, personel ve ürün ile temas eden yüzeyler de kontaminasyon kaynaklarıdır (7). *E. coli* O157:H7 serotipleri insanlarda çeşitli hastalıklara neden olan virulans faktörlerini içerirler. Bu faktörlerden en önemlileri şigatoksinerler, hemolizin, intimin ve pO157 plazmidir. Ayrıca ısıya dirençli enterotoksin (EAST 1) ve serinproteazlar da diğer virulans faktörleridir (8,9).

Shiga-benzeri toksinler (STX-1 ve STX-2); hemorajik kolitisi (HC), hemolitik üremik sendrom (HUS) ile trombotik trombotik purpura (TTP) gibi semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır ve *stx1* ve *stx2* genleri tarafından kodlanırlar (8,9). HUS görülen hastalardan genelde, böbrek endothelial hücrelerine daha fazla toksik olan STX-2 izole edilmektedir (9).

Barsak epitel hücrelerine yığılmayı sağlayan ve *eaeA* geni tarafından kodlanan intimin intestinal lezyonlara sebep olurken, *ehlyA* geni tarafından kodlanan enterohemolizin eritrositleri lize ederek

barsakta bakterinin canlı kalması için gerekli olan demir ihtiyacını karşılamaktadır (8,9).

Bu çalışmada; Samsun ilindeki bir broiler kesimhanesinde, tavuk etinin çapraz kontaminasyonunda önemli rolü olan haşlama tank suyu, tüy yolma makinesi, iç organlar, parçalama tahtası yüzeyi, iç organ çıkarma ünitesi, personel eli, broiler bağırsak içeriği ve karkas örneklerinde halk sağlığı açısından önemli bir patojen olan *E. coli* O157:H7 varlığını araştırmak amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Örnekler: Çalışmada, Ocak-Mayıs 2014 tarihleri arasında Samsun ilinde faaliyette bulunan kanatlı hayvan kesimhanesine 2'şer haftalık periyotlarla toplamda 10 kez yapılan ziyaretlerin her birinde 20'şer adet olmak üzere toplam 200 adet örnek materyal olarak kullanıldı (Tablo 1). Kesimhaneden her iki haftada bir 4 adet olmak üzere toplam 40 adet broiler karkas örneği, yine aynı kesimhanede her iki haftada bir 4 adet olmak üzere 40 adet tüm barsak (duodenum ve kloaka arası) örneği alındı. Kesim prosesinin farklı aşamalarından (20 tüy yolma makinesi, 10 kesme tahtası yüzeyi, 10 iç organ çıkarma ünitesi 20 personel eli, 40 broiler karkas örneği) 100 svap örneği temin edildi.

Tablo 1. Kesimhaneden alınan örnek çeşitleri ve sayıları

Table 1. Sample types and numbers taken from slaughterhouse.

Örnek	Sayı
Haşlama kazanı girişi su örneği	10
Haşlama kazanı çıkışı su örneği	10
Tüy yolma makinesi	20
İç organlar	40
Bağırsak içeriği	40
İç organ çıkarılma ünitesi	10
Kesme tahtası	10
Karkas	40
Personel	20
Toplam	200

Sıvap örnekleri kesme tahtası yüzeyleri ve iç organ çıkarma ünitesi, tüy yolma makinelerindeki plastik materyalden yapılmış parmakçıklardan, broiler karkas ve personelden alındı.

Karkastan örnekleme için, 25 mililitre % 0.1'lik steril peptonlu su ile nemlendirilen steril süngerler ve steril bir kalıp (13 × 10 × 0.25 cm) kullanıldı. Karkasın sol kanadı ve sol uyluğu arasındaki yüzeye kalıp sıkıca tutturularak nemli sünger ile 10 horizontal ve 10 vertikal sürtme hareketi ile yüzeye eşit basınç uygulamaya dikkat edilerek örneklendi (10).

Tahta ve içorgan çıkarma ünitesi yüzeyleri ve tüy yolma makinesinde örnekleme yüzeyini sınırlandırmak için 15 cm²'lik steril bir kalıp kullanıldı. Örnekleme 10 mL %0.1'lik steril peptonlu su içinde önceden nemlendirilmiş steril sıvaplar ile üç ayrı yöne

üç kez sürülerek yapıldı (10). Kesimhanede çalışan personelden sıvap örnekleri, çalışma saatleri boyunca tek bir ziyarette önceden bildirim yapılmaksızın toplandı. Elde sürüntü örnekleri, %0.1'lik peptonlu suda nemlendirilmiş steril sıvaplar kullanılarak iççilerin avuç içlerine ve parmaklara sürülerek toplandı (11).

Kesimi takiben aseptik koşullarda alınan örnekler soğuk zincir altında en kısa sürede laboratuvara transfer edildi ve 1-2 saat içerisinde *E. coli* O157:H7 varlığı yönünden analiz edildi.

Referans Suş: *E. coli* NCTC 12900 ve *E. coli* RHFS 232 referans suşları çalışmanın her aşamasında pozitif kontrol olarak kullanıldı.

Primerler: Çalışma kapsamında kullanılan primer dizileri Tablo 2.'de belirtilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan virulans genleri ve primer dizilimleri.
Table 2. Virulence genes and primer sequences used in the study.

Çalışmada Kullanılan Primerlerin Dizilimi	Gen Bölgesi	Virulans Genin Adı	Amplikon Büyüklüğü (bp)
P8-F CGTGATGATGTTGAGTTG P8-R AGATTGGTTGGCATTACTG	<i>rfbO157</i>	O157	420
FLICH7-F GCGCTGTCGAGTTCTATCGAGC FLICH7-R CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC	<i>fliC_{H7}</i>	H7	625
SLT1-F TGTAAGTGGAAAGGTGGAGTATACA SLT1-R GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	<i>Stx1</i>	Verocytotoxin1	210
SLTII-F GTTTTCTTCGGTATCCTATTCC SLTII-R GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC	<i>Stx2</i>	Verocytotoxin 2	484
AE-F ATTACCATCCACACAGACGGT AE-R ACAGCGTGGTTGGATCAACCT	<i>eaeA</i>	Intimin	397
MFS1-F ACGATGTGGTTTATTCTGGA MFS1-R CTTCACGTCACCATACATAT	<i>ehlyA</i>	Enterohemolysin	166

E. coli O157:H7 İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Ön Zenginleştirme ve İmmunomanyetik separasyon (IMS)

Çalışmada, karkas yüzeyinden 25mL tamponlanmış peptonlu su ile nemlendirilen süngerlerle alınan örnekler, haşlama kazanından alınan 25 mL su ve iç organlardan alınan 25 g örneklerle 225 mL, 20 mg/L novobiocin içeren mTSB ilave edilerek 2 dk süreyle homojenize edildi. Aynı şekilde kesimhaneden alınan sıvap örnekleri 10 mL mTSB+N içine konularak 37°C'de 16-18 saat inkübe

edildi (12). Ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan numuneler, Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Dynabeads anti-*E. coli* O157, Dynal, İngiltere) kullanılarak üretici firma tarafından bildirilen yöntemle göre IMS'ye tabi tutulduktan sonra O157 Dynabead ve bakteri kompleksinden 50 µL alınarak Cefixim - Tellurite (CT) içeren CHROM agar'a ekildi ve 37°C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda şüpheli kolonilere pozitif kontrol eşliğinde O157 ve H7 antiserumları (SSI, Danimarka) ile aglütinasyon testleri yapıldı (12).

fliC_{H7} ve *rfbO157* Geninin PZR ile Belirlenmesi

GF-1 (Vivantis, ABD) bakteri ekstraksiyon kit protokolüne göre elde edilen bakteri DNA'sında, *fliC_{H7}* geninin belirlenmesi için, final konsantrasyonu 50 µL olacak şekilde reaksiyon karışımı 5 µL DNA örneği, 5 µL 10 X PZR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 400 µM dNTPs, 0.5 µM her bir *fliC_{H7}* primerinden ve 1.5 U Taq polymerase'dan oluşturuldu. DNA amplifikasyonu, PZR cihazında (Techne TC-512) 94 °C'de 2 dk ön denatürasyon işlemi uygulandıktan sonra 35 siklus olacak şekilde 94 °C'de 20 s, 54 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 10 dk son uzatma işlemi gerçekleştirildi (13). *rfbO157* geninin belirlenmesi için uygulanan amplifikasyon işlemi ise; ön denatürasyon işlemi 94 °C'de 5 dk uygulandıktan sonra 94 °C'de 1 dk, 53 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk 30 siklus olacak şekilde bekletildi. Son uzatma işlemi 72 °C'de 5 dk gerçekleştirildi (14).

Multipleks PZR ile Virulans Faktörlerin Belirlenmesi

Çalışmada elde edilen izolatlar, *E. coli* O157:H7 serotipinde bulunabilecek virulans faktörlerine ait gen bölgeleri (*stx1*, *stx2*, *eaeA* and *hlyA*) açısından spesifik primerler (Tablo 2) kullanılarak analiz edildi (13). PZR reaksiyon karışımı, final volümü 50 µL olacak şekilde 5 µL DNA örneği, 5 µL 10 X PZR buffer, 3 mM MgCl₂, 400 µM dNTPs, her bir primerden 0.5 µM ve 1.5 U Taq polymerase olacak şekilde hazırlandı. PZR, 94 °C'de 2 dk ön denatürasyondan sonra 36 siklus olarak 94 °C'de 20 s, 54 °C'de 1 dk ve 72 °C'de 1dk olarak gerçekleştirildi ve son uzatma 72 °C'de 10 dakika olarak tamamlandı (13). Çalışmada, elde edilen ampliconlar % 1.5'lük agaroz jelde elektroforeze (EC250-90; Thermo, Pittsburgh, PA, ABD) tabi tutuldu ve sonuçlar jel dokümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, Marne La Vallee, Fransa) görüntülendi (13, 14).

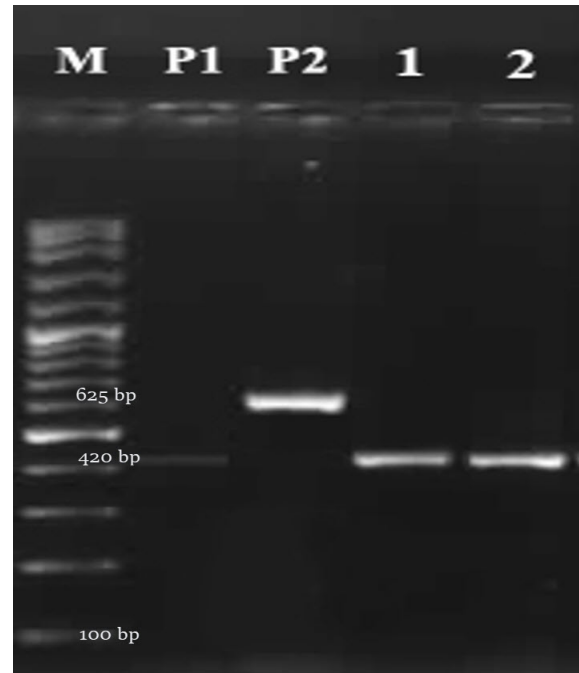
BULGULAR

Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları: Çalışmada fenotipik testler sonucunda incelenen örneklerin 18'i (%9) *E. coli* O157:H7 şüpheli pozitif olarak

değerlendirildi. İzolatların 4'ünün (%22.2) karkasa, 2'sinin (%11.1) personele, 4'ünün (%22.2) iç organlara, 3'ünün (%16.6) haşlama tank suyu ve 5'inin (%27.7) bağırsak içeriğine ait olduğu belirlendi. O ve H antiserumu ile yapılan lateks aglütinasyon testi sonucunda 18 pozitif örnekten sadece 2'sinin O157 antijeni yönünden pozitif olduğu ve örneklerin tamamının H7 antijeni açısından negatif olduğu saptandı.

Moleküler Analiz Sonuçları

PZR analizi sonucunda serolojik testlere paralel olarak incelenen örneklerin sadece 2'inde (%1) *rfbO157* geni tespit edilirken *fliC_{H7}* genine rastlanılmadı. *E. coli* O157 olarak tanımlanan 2 izolatın bağırsak içeriğine ait olduğu belirlendi (Şekil 1) ve bu 2 izolatta *stx1*, *stx2*, *eaeA* ve *ehlyA* genleri belirlendi (Tablo 3, Şekil 2).



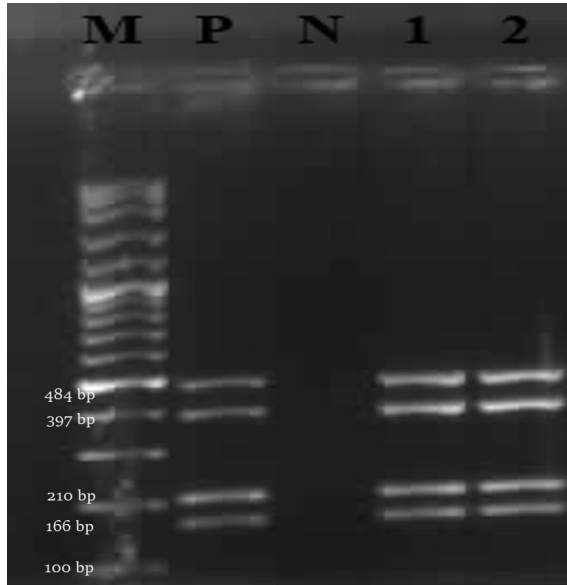
Şekil 1. *fliCh7* ve *rfbO157* genleri için PZR sonuçları; M: Marker (100bp), P1: Pozitif kontrol (O157: 420 bp), P2: Pozitif kontrol (H7: 625 bp), 1-2 Nolu bandlar: *E. coli* O157 (bağırsak içerik numunesi).

Figure 1. PCR results for *fliCh7* and *rfbO157* genes; M: Marker (100bp), P1: Positive control (O157: 420 bp), P2: Positive control (H7: 625 bp), Line 1-2: *E. coli* O157 (intestinal content sample).

Tablo 3 Örneklerden izole edilen *E. coli*.**Table 3.** *E. coli* isolated from samples.

Örnek	Örnek sayısı	Fenotipik test sonucunda <i>E. coli</i> O157:H7 şüpheli pozitif (%)	Serolojik analiz Sonuçları		PZR analiz sonucu		Virulans Faktörler			
			O157 (%)	H7 (%)	<i>E. coli</i> O157 (%)	<i>E. coli</i> O157:H7 (%)	<i>stx1</i>	<i>stx2</i> ,	<i>eaeA</i>	<i>ehlyA</i>
Karkas	40	4 (22.2)	-	-	-	-	+	+	+	+
İç organ çıkarılma ünitesi	10	-	-	-	-	-				
Kesme tahtası	10	-	-	-	-	-				
İç organ	40	4 (22.2)	-	-	-	-				
Haşlama suyu	20	3 (16.6)								
Tüy yolma makinası	20									
Bağırsak içeriği	40	5 (27.7)	2 (5)	-	2 (5)	-	+	+	+	+
Personel eli	20	2 (11.1)	-	-	-	-				
Toplam	200	18 (9)	2(1)	-	2(1)	-				

O157:H7 serotipi dağılımı.



Şekil 2. PZR işlemi sonucunda virulans genlerinin gösterilmesi; M: Marker (100bp), P: Pozitif kontrol (*ehlyA*; 166 bp, *stx1*:210 bp, *eaeA*:397bp *stx2*: 484), 1-2 Nolu bandlar: pozitif örnekler (*stx1*, *stx2*, *eaeA* ve *ehlyA*)

Figure 2 Demonstration of virulence genes as a result of PCR; M: Marker (100bp), P1: Positive control (*ehlyA*; 166 bp, *stx1*:210 bp, *eaeA*:397bp *stx2*: 484), Line 1-2: positive samples (*stx1*, *stx2*, *eaeA* and *ehlyA*)

TARTIŞMA ve SONUÇ

E. coli O157:H7 serotipinin insanlara taşınmasında sığırlar önemli bir rezervuar olmasına rağmen, son dönemlerde yapılan bazı çalışmalar kanatlı ve ürünlerinin de etkenin taşınmasında önemli rol oynadığını göstermiştir (9,15,16). Gıdalarla alınan etkenin çok düşük sayılarda (10-100 hücre) bile hastalık oluşturabileceği bildirilmiştir (17). Bu durum halk sağlığı açısından *E. coli* O157: H7'nin önemini göstermektedir.

Bu çalışmada incelenen örneklerden 2 bağırsak içeriğinde (%1) *E. coli* O157 tespit edildi. Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak, Heuvelink ve ark. (18), Jo ve ark. (19), Kalın ve ark. (20), ve Abay ve ark. (21) inceledikleri broiler dışkı örneklerinin hiçbirinde etkeni tespit edememişlerdir.

Raji ve ark. (22) 120 tavuk bağırsak içeriğinin 11 (%9.6)'inde, Sekmen ve Kaya (23) inceledikleri broiler kloakal svab örneğinin 32 (%6.40)'sinde *E. coli*

O157:H7 identifiye etmişlerdir. Yine, Tabatabaei ve ark. (24) 350 broiler dışkı örneğinin 14 (%4)'ünde, shiga toxigenic *E. coli* (STEC) tespit etmişlerdir.

Bu çalışma sonucu ve kanatlı dışkısından *E. coli* O157:H7 izole edilen diğer çalışma sonuçları (22-24) etkenin sekumda kolonize olup uzun süre boyunca dışkıyla saçılacağı ve kontaminasyonlara neden olabileceğini göstermektedir. Beery ve ark. (25)'nin civcivlerin oral yolla etken ile kontaminasyondan 5 ay sonrasında kadar dışkılarında 10^8 kob/g civarında *E. coli* O157:H7 serotipinin bulunduğunu bildirmeleri de kanatlıların bu etken yönünden rezervuar olarak dikkate alınmaları gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada, kesimhanedeki karkas örneklerinin hiçbirinden etken izole edilmemiştir. Benzer şekilde, Abay ve ark (21), Baran ve Gülmez (26) Kalın ve ark (20) ve Balpetek (27) inceledikleri kanatlı karkas sıvap örneklerinin hiç birisinin *E. coli* O157 ile kontamine olmadığını bildirmişlerdir. Fakat, Doyle ve Schoeni (15), Akkaya ve ark. (28) ve Olatoye ve ark. (29) inceledikleri tavuk eti örneklerinin sırası ile 4 (%1.52), 2(%1.05), 58 (%14.5)'ünde *E. coli*O157:H7 izole etmişlerdir. Sonuçlardaki farklılıklar *E. coli* suşlarındaki serotipik dağılımın bölgesel ve ülkesel olarak değişebilmesi (22,24,30) ve kullanılan farklı izolasyon metotları, örnekleme metodundaki farklılıklar (12,30) ve hayvanların kesimi esnasındaki hijyenik koşullara bağlanabilir.

Bu çalışmada, izole edilen *E. coli* O157 serotiplerinin her birinin *stx1*, *stx2*, *eaeA* ve *hlyA* genlerinin hepsini içerdiği belirlendi. Bu genlerin bir örnekte kombine bir şekilde bulunması, genellikle hayli güçlü bir virulent genetik karışımı olarak kabul edilir (31). Ayrıca incelenen izolatlarda *stx1* ve *stx2* geninin bulunması HUS açısından önemlidir. Çünkü *stx1* ve *stx2* toksinini üreten suşların HUS oluşumunda daha etkin rol aldığı belirtilmiştir (8,32).

Sonuç olarak, bu çalışmada Samsun ilindeki bir kanatlı kesimhanesinde kesilen broilere ait dışkı örneklerinin %1'inde *E. coli* O157 kontaminasyonu belirlenmiştir. Bununla birlikte, elde edilen izolatların hepsinde *aeA* ve *ehlyA*, *stx1* ve *stx2* genlerini birlikte içermeleri göz önüne alındığında bu ilde

kesilen kanatlıların insanlarda HUS, HC, TTP gibi şiddetli enfeksiyon ve bazen de ölümlere neden olan patojenik *E. coli* O157 serotipi için önemli bir rezervuar olduklarını göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. Adu-Gyamfi A., Torgby-Tetteh W., Appiah V., 2012. Microbiological quality of chicken sold in accra and determination of D10-value of *E. coli*. *Food Nutr Sci*, 3, 693-698.
2. Alvarez-Astorga M., Capita R., Alonso-Calleja C., Moreno B., Garcia-Fernandez MC., 2002. Microbiological quality of retail chicken by-products in Spain. *Meat Sci*, 62, 45-50.
3. Caya F., Fairbrother JM., Lessard L., Quessy S., 1999. Characterization of the risk to human health of pathogenic *Escherichia coli* isolates from chicken carcasses. *J Food Prot*, 62, 741-746.
4. Amara A., Badoum M., Faid M., Bouzoubaa K., 2002. Microbial contamination of poultry slaughtered in traditional shops in Morocco. *Microbiol Aliments Nutr*, 1994, 12, 323-327.
5. Tonbak F., Atasever M., Çalıcıoğlu M. 2017. Kanatlı etlerinde salmonella riski. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12, 90-98.
6. Abdissa R., Haile W., Fite AT., Beyi AF., Agga GE., Edao BM., Tadesse F., Korsa MG., Beyene T., Beyene TJ., De Zutter L., Cox E., Goddeeris BM., 2017. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in beef cattle at slaughter and beef carcasses at retail shops in Ethiopia. *BMC Infect Dis*, 17, 277-283.
7. Gill CO., Jones T. 2002. Effects of wearing knitted or rubber gloves on the transfer of *Escherichia coli* between hands and meat. *J Food Prot*, 65, 1045-1048.
8. Posse B., De Zutter L., Heyndrickx M., Herman L., 2007. Metabolic and genetic profiling of clinical O157 and non-O157 shiga-toxin-producing *Escherichia coli*. *Res Microbiol*, 158, 591-599.
9. Guran HS., Vural A., Erkan ME., Durmusoglu H., 2017. Prevalence and some virulence genes of *Escherichia coli* O157 isolated from chicken meats and giblets. *Ann Anim Sci*, 17, 555-563.
10. Sweum WH., Moberg LJ., Rude RA., Frank JF., 1992. Microbiological monitoring of the food processing environment. In: "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", Eds., C Vanderzant, DF Splittstoesser, 3rd ed., 51-74, American Public Health Association, D.C. Washington.
11. Okareh OT., Erhahon OO., 2015. Microbiological assessment of food and hand-swabs samples of school food vendors in Benin City, Nigeria. *Food and Public Health*, 5, 23-28.
12. Islam MA., Mondol AS., de Boer E., Beumer RR., Zwietering MH., Talukder KA., Heuvelink AE., 2008. Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Appl Environ Microbiol*, 74, 5414-5421.
13. Sarimehmetoglu B., Aksoy MH., Ayaz ND., Ayaz Y., Küplülü Ö., Kaplan YZ., 2009. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef using immunomagnetic separation and multiplex PCR. *Food Control*, 20, 357-361.
14. Aslantaş Ö., Erdoğan S., Cantekin Z., Gülaçtı İ., Evrendilek GA., 2006. Isolation of characterization verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from Turkish cattle. *Int J Food Microbiol*, 106, 338-342.
15. Doyle MP., Schoeni JL., 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol*, 53, 2394-2396.
16. Hızlısoy H., Al S., Onmaz NE., Yıldırım Y., Gönülalan Z., Gümüşsoy KS., 2017. Antimicrobial resistance profiles and virulence factors of *Escherichia coli* O157 collected from a poultry processing plant. *Turk J Vet Anim Sci*, 41, 65-71.
17. Hessain AM., Al-Arfaj AA., Zakri AM., El-Jakee JK., Al-Zogibi OG., Hemeg HA., İbrahim IM., 2015. Molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 recovered from meat and meat products relevant to human health in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci*, 22, 725-729.

18. Heuvelink AE., Zwartkruis-Nahuis JT., Van den Biggelaar FL., Van Leeuwen WJ., De Boer E., 1999. Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. *Int J Food Microbiol*, 52, 67-75.
19. Jo MY., Kim JH., Lim JH., Kang MY., Koh HB., Park YH., Yoon DY., Chae JS., Eo SK., Lee JH., 2004. Prevalence and characteristics of *Escherichia coli* O157 from major food animals in Korea. *Int J Food Microbiol*, 95, 41-49.
20. Kalin R., Öngör H., Çetinkaya B., 2012. Isolation and molecular characterization of *Escherichia coli* O157 from broiler and human samples. *Foodborne Paht Dis*, 9, 313-318.
21. Abay S., Aydın F., Ertaş N., Hizlisoy H., Erdoğan S., Gönülalan Z., 2014. Kanatlılardan *Escherichia coli* O157 izolasyonu üzerine çalışmalar. *Erc Univ Vet Fak Derg*, 11, 1-6.
22. Raji MA., Minga UM., Machang'u RS., 2006. Prevalence and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 isolated from local chicken in Morogoro, Tanzania. *J Anim Vet Advan*, 5, 952-958.
23. Sekmen SGD., Kaya O., 2010. Broiler piliçlerden *Escherichia coli* O157:H7 serotipinin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi. *Pendik Vet Mikrobiyol Derg*, 37, 19-31.
24. Tabatabaei M., Mekarizade A., Foad-Marashi N., 2011. Detection and molecular characterization of sorbitol negative shiga toxigenic *Escherichia coli* in chicken from northwest of Iran. *Vet Res Forum*, 2, 183-188.
25. Beery JT., Doyle MP., Schoeni JL., 1985. Colonization of chicken caeca by *Escherichia coli* associated with hemorrhagic colitis. *Appl Environ Microbiol*, 49, 310-315.
26. Baran F., Gülmez M., 2003. The occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in the ground beef and chicken drum sticks. *Internet J Food Safety*, 2, 13-15.
27. Balpetek D., Gürbüz Ü., 2010. Bazı et ürünlerinde *E. coli* O157:H7 varlığının araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 26, 25-31.
28. Akkaya L., Atabay HI., Kenar B., Alisarlı M., 2006. Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 on chicken carcasses sold in Turkey. *Bull Vet Inst Pulawy*, 50, 513-516.
29. Olatoye IO., Amosun EA., Ogundipe GA., 2012. Multidrug resistant *Escherichia coli* O157 contamination of beef and chicken in municipal Abattoirs of Southwest Nigeria. *Nat Sci*, 10, 125-132.
30. Ojo OE., Ajuwape ATP., Otesile EB., Owoade AA., Oyekunle MA., Adetosoye Al., 2010. Potentially zoonotic shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups in the faeces and meat of food-producing animals in Ibadan, Nigeria. *Int J Food Microbiol*, 142, 214-221.
31. Murinda SE., Nguyen LT., Landers TL., Draughon A., Mathew AG., Hogan JS., Smith LK., Hancock DD., Oliver SP., 2004. Comparison of *Escherichia coli* isolates from humans, food, and farm and companion animals for presence of shiga toxin-producing *E. coli* virulence markers. *Foodborne Pathog Dis*, 1, 181-184.
32. Etcheverria AI., Padola NL., Sanz ME., Polifroni R., Krüger A., Passucci J., Rodriguez EM., Taraborelli AL., Ballerio M., Parma AE., 2010. Occurrence of shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) on carcasses and retail beef cuts in the marketing chain of beef in Argentina. *Meat Sci*, 86, 418-421.



Etlik Piliç Yemlerinde Metiyonin Kaynağı olarak 2-Hidroksi-4-(Metiltiyolo) Butanoik Asit Kullanımı*

Sarper ÖZBEK¹, Adnan ŞEHU²

1. CP Group, Yem Teknoloji Departmanı, İstanbul, TÜRKİYE.
2. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
09.12.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Özbek S, Şehu A: Etlik Piliç Yemlerinde Metiyonin Kaynağı olarak 2-Hidroksi-4-(Metiltiyolo) Butanoik Asit Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 293-300, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.364183

Öz: Araştırma, etlik piliç yemlerinde metiyonin yerine metiyonin hidroksi analogu olan 2-hidroksi-4-(metiltiyolo) butanoik asidin (HMB) kullanımının etlik piliç performansı üzerine etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Toplam 256 adet eşit sayıda dişi ve erkek etlik civciv kullanılmıştır. Her birinde 64 adet civciv bulunan 1 kontrol ve 3 deneme grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturulmuştur. Her bir grup, dişi erkek sayısı eşit olan 16' şar civcivden oluşan 4 alt gruba bölünmüştür. Yemler mısır ve soya fasulyesi küspesi bazlı hazırlanmıştır. Kontrol grubunun yemine % 0.20 düzeylerinde DL-metiyonin, diğer 3 deneme grubuna sırasıyla %0.15, 0.20 ve 0.25 düzeyinde HMB ilavesi yapılmıştır. Çalışma sonunda canlı ağırlık, yem tüketimi, canlı ağırlık artışı, yemden yararlanma bakımından istatistikî farklılık olmadığı saptanmıştır (P>0.05). Ancak % 0.20 düzeyinde HMB içeren yemi tüketen grup ile kontrol grubunun canlı ağırlıkları birbirine çok yakın olmasına karşın % 0.15 ve 0.25 HMB içeren yemi tüketen deneme gruplarında çalışma sonu canlı ağırlık 55 g kadar daha düşük olmuştur. Bu veriler metiyonin hidroksi analogu olan HMB'in etlik piliç yemlerinde DL-metiyonine alternatif yem katkı maddesi olarak yerine kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Etlik piliç, 2-Hidroksi-4-(Metiltiyolo) Butanoik Asit, Metiyonin, Performans.

Using 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid as a Source of Methionine in Broiler Diets

Abstract: An experiment was carried out to determine the effects of using DL-methionine hydroxy analog 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic acid (HMB) in broiler diets instead of methionine on broiler performance. Totally 256 female and male equal number of broiler chicks were used. A total of 4 groups, 1 control and 3 experimental group, were formed which contains 64 chicks in each of them. Each group divided into 4 subgroups which contains 16 equal numbers of female and male chicks. Rations were corn-soybean meal based. The 0.20% DL-methionine was added to control diet and HMB added to other three treatment groups 0.15, 0.20 and 0.25%, respectively. At the end of experiment there were no statistically differences observed in live weight, feed consumption, live weight gain and feed efficiency (P>0.05). However, although the live weight of the group that consumed 0.20% HMB and the control group were very close to each other, the live weight was lower about 55 g at the experimental groups consumed 0.15% and 0.25% HMB. These data shows that HMB which is DL-methionine hydroxy analog can be used as an alternative diet supplement to DL-methionine in broiler diets.

Keywords: Broiler, 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic acid, Methionine, Performance.

✉ Sarper ÖZBEK

CP Group, Yem Teknoloji Departmanı, İstanbul, TÜRKİYE.

e-posta: sarperozbek@gmail.com

*Sarper Özbek Doktora tezinden özetlenmiş ve güncellenmiştir.

GİRİŞ

Metiyonin kanatlı yemlerinde mutlaka bulunması gereken esansiyel aminoasitlerden bir tanesidir. Etlik piliç yemleri genellikle mısır ve soya bazlı olduğundan metiyonin yönünden yetersiz kalmakta ve ilavesi gerekmektedir. Çoğunlukla karaciğer ve böbrekte, kükürt kapsayan bu aminoasitten yine kükürt kapsayan sistin ve sistein sentezlenir (1,2,3). Yağ transport ve metabolizmasında, detoksifikasyon olaylarında gerekli olan metiyonin etlik piliçlerin 42 günlük süreçte iyi bir canlı ağırlık artışı ve yemden yararlanma oranına ulaşmaları için esansiyeldir (4,5). Dikicioğlu ve ark. (4), yaptıkları çalışmada etlik piliçlerde sıvı metiyonin ilavesinin canlı ağırlık kazancı, yemden yararlanma ve karkas randımanını olumlu etkilediğini bildirmişlerdir.

Sentetik metiyonin olan DL-Metiyonin yerine metiyonin hidroksi analoglarının kullanılmasının değerlendirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Metiyonin hidroksi analogu olan 2-Hidroksi-4-(Metiltiyo) Butanoik Asit (HMB) ise amino grup içeren DL-metiyoninin aksine α -karbon atomunda hidroksil grubu taşıyan kimyasal olarak sentezlenmiş metiyonin prekürsürüdür. Asimetrik karbon atomunda hidroksil grubu taşıması ile kimyasal olarak farklılık gösteren HMB protein sentezinde DL-Metiyonin ile aynı yolu izler. Metiyonin kaynağı fark etmeksizin bütün metiyonin kaynakları gastro-intestinal sistemden emilerek L-metiyonine çevrilir ve protein sentezinde kullanılır (1,3,6-10).

Farklı metiyonin kaynaklarının *in_vivo* absorpsiyonunu ile ilgili bazı çalışmalarda (11-16)

farklılık bulunmuş bazılarında ise herhangi bir farklılık bulunmamıştır (2,17). HMB ile yapılan çalışmalar bunun tavuk yemlerinde de metiyonin yerine kullanılabilirliğini göstermektedir (17). Bu çalışmanın hipotezi HMB'in metiyonin yerine kullanılabilirliğinin test edilmesidir. Hayvan denemelerinde çok farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. HMB ile geçmiş yıllarda bazı çalışmalar yapılmış olmasına karşın; konu hakkındaki bilgi birikimini ve güveni artırmak, HMB'in metiyonin ile aynı etkiyi gösterip göstermediği konusunda yem sanayisinin tereddütüne katkı sağlamak amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Araştırma; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Deneme Ünitesi'nde, 09.07.2008 tarihli ve 2008-22-106 karar numaralı Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Kararı alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

Araştırmada toplam 256 adet günlük *Ross 308 etlik civciv* kullanılmıştır. Araştırma her biri 64 adet olan 1 kontrol grubu ve 3 deneme grubu olmak üzere toplam 4 grup halinde ve her grupta eşit sayıda dişi-erkek civciv ile yürütülmüştür. Her bir grup, dişi erkek sayısı eşit olan 16' şar civcivden oluşan 4 alt gruba bölünmüştür. Araştırmanın 0-3 haftasında %21.5 ham protein ve 3200 kcal/kg metabolik enerji yem; 4-6 haftasında ise %19.5 ham protein ve 3200 kcal/kg metabolik enerji içeren yemler yedirilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Denemede kullanılan yemlerin bileşimi.
Table 1. Nutrient composition of diets used in the experiment.

	Deneme Grupları			
	Kontrol Grubu	1	2	3
Civciv Yeminin Bileşimi (0-3 hafta)				
Mısır, %	46.9	46.9	46.9	46.9
Soya Fasulyesi Küspesi, %	34	34	34	34
Tam Yağlı Soya, %	11	11	11	11
Bitkisel Yağ, %	4	4	4	4
Dikalsiyum fosfat, %	2	2	2	2
Mermer tozu, %	1.2	1.2	1.2	1.2
Tuz, %	0.4	0.4	0.4	0.4
Vitamin, %	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral, %	0.1	0.1	0.1	0.1
DL-Metiyonin, %	0.2	0.0	0.0	0.0
HMB, %	0.0	0.15	0.20	0.25
Antikoksidiyel, %	0.5	0.5	0.5	0.5
Analiz Sonuçları				
ME, kcal/kg*	3229.8	3229.04	3265.52	3231.32
Ham Protein, %	21.75	21.50	21.86	21.63
Ham Yağ, %	8.64	8.58	8.62	8.55
Kalsiyum, %	1.16	1.21	1.19	1.14
Fosfor, %	0.71	0.73	0.73	0.73
Yemlerdeki Metiyonin ve Sistin Miktarları				
Metiyonin İhtiyaç, %**	0.48	0.48	0.48	0.48
Metiyonin Miktarı, %***	0.365	0.365	0.365	0.365
İlave metiyonin veya HMB, %	0.20	0.15	0.20	0.25
Toplam metiyonin veya HMB, %	0.565	0.515	0.565	0.615
Metiyonin + Sistin İhtiyaç, %**	1.00	1.00	1.00	1.00
Metiyonin + Sistin Miktarı, %***	0.737	0.737	0.737	0.737
İlave metiyonin veya HMB, %	0.20	0.15	0.20	0.25
Toplam metiyonin + sistin, %	0.937	0.887	0.937	0.987
Piliç Yeminin Bileşimi (4-6 hafta)				
Mısır, %	52.1	52.1	52.1	52.1
Soya Fasulyesi Küspesi, %	29	29	29	29
Tam Yağlı Soya, %	10	10	10	10
Bitkisel Yağ, %	5	5	5	5
Dikalsiyum fosfat, %	2	2	2	2
Mermer tozu, %	1	1	1	1
Tuz, %	0.4	0.4	0.4	0.4
Vitamin, %	0.2	0.2	0.2	0.2
Mineral, %	0.1	0.1	0.1	0.1
DL-Metiyonin, %	0.2	0.0	0.0	0.0
HMB, %	0.0	0.15	0.20	0.25
Antikoksidiyel, %	0.5	0.5	0.5	0.5
Analiz Sonuçları				
ME, kcal/kg*	3198.64	3191.42	3192.56	3208.14
Ham Protein, %	19.55	19.65	19.41	19.43
Ham Yağ, %	9.48	9.28	9.40	9.48

Tablo 1. Denemede kullanılan yemlerin bileşimi (Devamı).**Table 1.** Nutrient composition of diets used in the experiment (Continues).

Kalsiyum, %	1.05	1.13	1.27	1.19
Fosfor, %	0.72	0.69	0.71	0.69
Yemlerdeki Metiyonin ve Sistin Miktarları				
Metiyonin İhtiyaç, %**	0.41	0.41	0.41	0.41
Metiyonin Miktarı, %***	0.336	0.336	0.336	0.336
İlave metiyonin veya HMB, %	0.20	0.15	0.20	0.25
Toplam metiyonin veya HMB, %	0.536	0.486	0.536	0.586
Metiyonin + Sistin İhtiyaç, %**	0.86	0.86	0.86	0.86
Metiyonin + Sistin Miktarı, %***	0.679	0.679	0.679	0.679
İlave metiyonin veya HMB, %	0.20	0.15	0.20	0.25
Toplam metiyonin + sistin, %	0.879	0.829	0.879	0.929

*ME = Metabolize olabilir Enerji, ** Aviagen'de (18) belirtilen ihtiyaç miktarından elde edilen oranlardır, ***Yemlerde kullanılan ham maddelerden gelen ve hesaplanarak bulunan miktarlardır.

Tablo 1'de de görüleceği gibi yemlerde protein büyük ölçüde soya fasulyesi küspesi ve tam yağlı soyadan karşılanmıştır. Hesaplama yöntemi ile yemlerde belirlenen metiyonin ve kükürtlü amino asit (metiyonin ve sistin) oranları, Aviagen (18)' de dönemlere göre yemlerde olması tavsiye edilen metiyonin ve toplam kükürtlü amino asit miktarları ile kıyaslanarak eksiklik tespit edilmiş ve ona göre metiyonin yada HMB ilavesi yapılmıştır. Burada daha çok kükürtlü amino asit miktarları göz önüne alınmıştır. Deneme gruplarının yemlerine kontrol grubuna ilavesi yapılan %0.20 DL-metiyonin yerine sırasıyla %0.15, 0.20 ve 0.25 HMB katılmıştır. Deneme grubu yemlerine HMB farklı dozlarda kullanılmak sureti ile HMB'nin hangi düzeyinin metiyonine karşı benzer etkiyi sağlayabileceği test edilmiştir. Alt gruplara grup yemlemesi uygulanmış ve tüketebilecekleri miktarda yem ve su sürekli olarak önlerinde hazır bulundurulmuştur. Deneme 42 gün sürdürülmüştür.

Denemede 24 saatlik aydınlatma planı uygulanmıştır. Deneme süresince günlük olarak ölümler ve olası nedenleri kaydedilmiştir.

Araştırmada kullanılan karma yemlerin besin madde miktarları Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Laboratuvarları' nda AOAC (19)' de belirtilen yöntemlere göre belirlenmiştir. Metabolize olabilir enerji düzeylerinin hesaplanmasında TSE (20)' nin önerdiği formül kullanılmıştır.

Canlı ağırlık artışının belirlenmesi için haftalık tartımlar yapılmıştır. Yem tüketimi alt gruplarda artan yem verilen toplam yem miktarından çıkartılarak haftalık olarak tespit edilmiştir. Haftalık yem tüketimi hayvan sayısına bölünerek yem tüketimleri, alt grupların ortalamaları olarak hesaplanmıştır.

Yemden yararlanma oranları haftalık ortalama yem tüketiminin canlı ağırlık artışına bölünmesi ile hesaplanmıştır.

Karkas randımanı ve iç organ ağırlıkları için denemenin 42. gününde her alt gruptan rastgele 2 erkek 2 dişi olmak üzere toplam 4 hayvan alınmıştır. Karkaslar kesim işlemi tamamlandıktan hemen sonra tartılarak sıcak karkas ağırlıkları belirlenmiştir ve bu değer kesim öncesi canlı ağırlıklarına bölünerek sıcak karkas randımanı hesaplanmıştır:

Sıcak karkas randımanı, % = Sıcak karkas ağırlığı (g) / Kesim öncesi canlı ağırlık (g) *100

İstatistiksel Analiz

Gruplarda canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma derecesi, sıcak karkas randımanı bakımından gruplara ait istatistiksel hesaplamalar ve grupların ortalama değerleri arasındaki farklılıkların önemliliği için varyans analiz metodu, gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için Duncan testi uygulanmıştır. İstatistiksel analizler SPSS 11.5 (21) programında gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

Hazırlanan yemlerin performans, karkas ve iç organ ağırlıkları üzerindeki etkileri Tablo 2 ve 3' te verilmiştir. Metiyonin kullanılan kontrol grubu ile HMB kullanılan deneme grupları karşılaştırıldığında canlı ağırlık, yem tüketimi, canlı ağırlık artışı, ölüm

oranı ve yemden yararlanma bakımından önemli bir farklılık olmadığı gözlemlenmiştir. Ancak % 0.20 düzeyinde HMB içeren yemi tüketen grup ile kontrol grubunun canlı ağırlıkları birbirine çok yakın olmasına karşın %0.15 ve 0.25 HMB içeren yemi tüketen deneme gruplarında besi sonu canlı ağırlık 55 g kadar daha düşük olmuştur.

Tablo 2. Deneme gruplarının 42 günlük ortalama besi performansları.**Table 2.** 42-day average growth performance of the experimental groups.

Parametreler	Kontrol grubu				Deneme Grupları				p
	%0.2 metiyonin		%0.15 HMB		%0.20 HMB		%0.25 HMB		
	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	
Canlı ağırlık, g	2501.14	38.88	2445.63	41.36	2506.91	9.08	2442.13	36.52	0.415
Canlı ağırlık artışı, g	2458.86	38.83	2403.70	41.83	2463.87	8.74	2399.58	36.29	0.415
Toplam yem tüketimi, g	4450.02	75.25	4547.39	52.48	4523.56	35.29	4387.33	72.86	0.286
Yemden Yararlanma oranı (kg yem/kg CAA)	1.809	0.02	1.893	0.03	1.836	0.01	1.829	0.03	0.171

Gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan önemsizdir (P>0.05).

Tablo 3. Deneme gruplarının karkas randımanları ve bazı organların canlı ağırlığa oranları.**Table 3.** Ratio of some organs to live weight and carcass yields of the experimental groups.

Karkas Özellikleri (Dişi-Erkek karışık)	Kontrol grubu				Deneme grupları				p
	%0.2 metiyonin		%0.15 HMB		%0.20 HMB		%0.25 HMB		
	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	
Karkas Randımanı, %	73.02	0.46	72.41	0.31	73.26	0.42	72.64	0.44	0.469
Göğüs, g/100g CA	32.49a	0.37	30.99b	0.36	31.76ab	0.29	31.11b	0.42	0.018
But, g/100g CA	28.47	0.30	29.28	0.32	29.28	0.36	29.29	0.20	0.161
Kanat, g/100g CA	8.14	0.14	8.15	0.09	8.17	0.18	8.31	0.08	0.766
Boyun, g/100g CA	3.71	0.09	3.88	0.09	3.99	0.11	3.84	0.10	0.261
Karaciğer, g/kg CA	20.16	0.59	21.60	1.17	20.85	0.96	19.96	0.54	0.529
Kalp, g/kg CA	5.39	0.16	5.49	0.18	5.71	0.17	5.33	0.11	0.354

Tablo 3. Deneme gruplarının karkas randımanları ve bazı organların canlı ağırlığa oranları (Devamı).
Table 3. Ratio of some organs to live weight and carcass yields of the experimental groups (Continues).

Kloaka yağı, g/kg CA	7.66	0.76	8.62	0.86	8.73	0.81	7.81	0.74	0.703
Bursa Fabricius, g/kg CA	1.71	0.11	1.50	0.20	1.56	0.16	1.84	0.14	0.443
Dalak, g/kg CA	1.36	0.10	1.47	0.12	1.62	0.12	1.33	0.17	0.394
Taşlık, g/kg CA	13.29	0.44	12.92	0.43	13.95	0.52	12.89	0.58	0.408

Farklı harf taşıyan değerlerde istatistik farklılık görülmüştür (P<0.05).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada yeme %0.15, 0.20 ve 0.25 düzeylerinde HMB katılması etlik piliçlerde canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranlarında yemine metiyonin katılan gruba göre önemli bir farklılık yaratmamıştır. Kontrol grubuna en yakın sonuçlar %0.20 HMB grubunda elde edilmiştir fakat HMB' in %0.15 düzeylerinde kullanılması da istatistik anlamda olumsuz bir sonuç yaratmamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda da DL-metiyonin, HMB ve L-metiyoninin kullanılmasının canlı ağırlık ve yemden yararlanma oranında herhangi bir farklılık yaratmadığı belirtilmektedir (17,22,23).

Dipner ve ark. (13), bu çalışmada olduğu gibi etlik piliçlerde HMB ve DL-metiyonini normal düzeylerde kullandıklarında performans verilerinde herhangi bir farka rastlamamıştır. Bu durum metiyonin kaynaklarının gastro-intestinal sistemden emilerek L-metiyonine çevrildiğinin göstergesidir (1,3,6,8-10). Ancak Dipner ve ark. (13), her iki metiyonin kaynağını yüksek düzeylerde kullandığında DL-metiyonin performans ve yem tüketimini olumsuz etkilemesi dikkat çekici olmuştur.

Bu çalışmada etlik piliç yemlerinde bulunması gereken metiyonin düzeyleri göz önüne alınmış, metiyoninle aynı oranda ya da metiyoninden %25 daha düşük ve %25 daha yüksek oranlarda HMB kullanılmıştır. Daha yüksek ya da daha düşük oranlarda kullanılan düzeylerde birbirine çok yakın sonuçlar elde edilmiştir ve bu da istatistiki açıdan bir önem taşımamaktadır. %0.24 düzeyinde sıvı

metiyonin hidroksi analogu kullanılan çalışmada (24) elde edilen sonuçlar bu çalışmaya göre yakınlık göstermektedir. Ancak Salary ve ark (25)'lerinin yaptığı çalışmada, HMB düzeyi 22 – 42 günlük periyotta arttırıldıkça (0.450, 0.562 ve 0.675 g/kg) canlı ağırlık artışının da arttığı bildirilmektedir.

Ribeiro ve Penz'in yaptıkları çalışmada (26), metiyonin kaynağı olarak DL-metiyonin ve HMB kullanılmış; performans, karkas değerleri, nitrojen tutma, telafi büyümesi değerlendirilmiştir. HMB içeren yemle beslenen grupta canlı ağırlık ve yemden yararlanma oranının bu çalışmanın aksine daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

İstatistik bir fark olmamasına karşın kontrol grubundan sonra en iyi göğüs eti randımanı %0.20 HMB içeren yemi tüketen grupta elde edilmiştir. İstatistiki açıdan bir farklılık olmamasına karşın en yüksek sıcak karkas randımanı %0.20 HMB içeren yemi tüketen gruptan elde edilmiş ve bunu kontrol grubu takip etmiştir. En düşük karkas randımanı ise istatistiki açıdan bir farklılık olmamasına karşın %0.15 HMB içerikli yemi tüketen grupta şekillenmiştir.

Sonuç olarak, %0.20 düzeylerinde HMB'in etlik piliç yemlerinde metiyonin kaynağı olarak kullanılmasında herhangi bir olumsuz veriye rastlanmamıştır. Çalışma neticesinde istatistiki açıdan bir farklılık oluşturmayan canlı ağırlık, canlı ağırlık artışı, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranları ayrı ayrı değerlendirilip ekonomik açıdan bir farklılık yaratıp yaratmayacağı tespit edilebilir. Bunun yanı sıra DL-metiyoninin HMB' e göre piyasada daha pahalı olması da göz önünde bulundurulmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Benevenga NJ., Fuller MF., Lall SP., McCracken KJ., Axford RFE., Omed HM., Phillips CJC., 2004. The Encyclopedia of Farm Animal Nutrition, 376-377. CABI Publishing, UK.
2. Dibner JJ., 1983. Utilization of supplemental methionine sources by primary cultures of chick hepatocytes. *J Nutr*, 113, 2216-2223.
3. Saunderson CL., 1985. Comparative metabolism of L-methionine, DL-methionine and DL-2-hydroxy-4-methylthio butanoic acid by broiler chicks. *Brit J Nutr*, 54, 621-633.
4. Dikicioğlu T., Ergün A., Saçaklı P., 1997. Broyler rasyonlarında sıvı metiyonin kullanımı. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 44, 237-248.
5. Wang S., Bottje WG., Song Z., Beers K., Vazquez-Anon M., Dipner JJ., 2001. Uptake of DL-2-Hydroxy-4-methylthio-butanoic Acid (DL-HMB) in the broiler liver in vivo. *J Poultry Sci*, 80, 1619-1624.
6. Jankowski J., Ognik K., Kubinska M., Czech A., Juskiwicz J., Zduńczyk Z., 2017. The effect of DL-, L-isomers and DL-hydroxy analog administered at 2 levels as dietary sources of methionine on the metabolic and antioxidant parameters and growth performance of turkeys. *Poultry Sci*, 96, 3229-3238.
7. Kluge H., Gessner DK., Herzog E., Eder K., 2016. Efficacy of DL-methionine hydroxy analogue-free acid in comparison to DL-methionine in growing male white Pekin ducks. *Poultry Sci*, 95, 590-594.
8. Kratzer DD., Littell RC., 2006. Appropriate statistical methods to compare dose responses of methionine sources. *J Poultry Sci*, 85, 947-954.
9. Martin-Venegas R., Geraert PA., Ferrer R., 2006. Conversion of the Methionine Hydroxy Analogue DL-2-Hydroxy-(4-Methylthio) Butanoic Acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. *J Poultry Sci*, 85, 1932-1938.
10. Sangali CP., Bruno LDG., Nunes RV., Neto ARO., Pozza PC., Oliveira MM., Frank R., Schöne RA., 2014. Bioavailability of different methionine sources for growing broilers. *R Bras Zootec*, 43, 140-145.
11. Dibner JJ., Durley RC., Kostelc JG., Ivey EJ., 1990. 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic acid is a naturally occurring methionine precursor in the chick. *J Nutr*, 120, 553-560.
12. Dibner JJ., Knight CD., 1984. Conversion of 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid to L-Methionine in the chick: A stereospecific pathway. *J Nutr*, 114, 1716-1723.
13. Dibner JJ., Vazquez-Anon M., Parker D., Gonzalez-Esquerria R., Yi IG., Knight, CD., 2004. Use of alimet feed supplement (2-Hydroxy-4(Methylthio) Butanoic Acid, HMTBA) for broiler production. *J Poultry Sci*, 41, 213-222.
14. Dupuis L., Saunderson CL., Puigserver A., Brachet, P., 1989. Oxidation of methionine and 2-hydroxy 4-methylthio butanoic acid stereoisomers in chicken tissues. *Brit J Nutr*, 62, 63-75.
15. Garlich JD., 1985. Response of broilers to DL-methionine hydroxy analog free acid, DL-methionine, and L-methionine. *J Poultry Sci*, 64, 1541-1548.
16. Salary J., Kalantar M., Dashtbin F., Hemati Matin HR., 2015. ALIMET (liquid methionine hydroxy analogue) in broiler chicken diets: immunity system, microflora population, and performance. *Arch Zootec*, 64, 57-62.
17. Zhang S., Saremi B., Gilbert ER., Wong EA., 2017. Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poultry Sci*, 96, 425-439.
18. Aviagen, 2007. Broiler Nutrition Specification: Ross 308. Huntsville, Alabama.
19. AOAC., 1990. Official Methods of Analysis, 15. Ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
20. TSE, 1991. Hayvan Yemleri. Metabolik (Cevrilebilir) Enerji Tayini (Kimyasal Metot). Türk Standartları Enstitüsü, TSE No: 9610, Aralık, Ankara.
21. SPSS, 2002. SPSS for windows base system user's guide, Version 11.5, USA.
22. Garlich JD., 1985. Response of broilers to DL-methionine hydroxy analog free acid, DL-methionine, and L-methionine. *J Poultry Sci*, 64, 1541-1548.

-
23. Tang X., Zhao Y., Le G., Shi Y., Sun J., 2016. Effects of methionine hydroxy analogue on intestinal function and oxidative status in broiler chickens. The Experimental Biology 2016 Meeting, San Diego, 232.
 24. Lemme A., Hoehler D., Brennan JJ., Mannion PF., 2002. Relative effectiveness of Methionine Hydroxy Analog compared to DL-methionine in Broiler Chickens. *J Poultry Sci*, 81, 838-845.
 25. Salary J., Kalantar M., Dashtbin F., Hemati Matin HR., 2015. ALIMET (liquid methionine hydroxy analogue) in broiler chicken diets: immunity system, microflora population, and performance. *Arch Zootec*, 64, 57-62.
 26. Ribeiro AML., Penz AM., 2001. Effects of 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid and DL-methionine on broiler performance and compensatory growth after exposure to two different environmental temperatures. *J Appl Poultry Res*, 10, 419-426.



Sağlıklı Koyunlarda Flunixin Meglumine ve Meloksikam Uygulamasının Koagülasyon Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması*

Sedat TURGUT¹, Yasin PARLATIR¹, Hasan ERDOĞAN¹, Serdar PAŞA¹✉

1. Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
07.11.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Turgut S, Parlatır Y, Erdoğan H, Paşa S: Sağlıklı Koyunlarda Flunixin Meglumine ve Meloksikam Uygulamasının Koagülasyon Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 301-308, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.352080

Öz: Bu çalışmada, sağlıklı koyunlarda flunixin meglumine ve meloksikam uygulamasının koagülasyon profili üzerine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Fiziksel muayene bulgularıyla birlikte hemogram ve biyokimyasal verileri fizyolojik sınırlar içerisinde olan hayvanlar çalışma kapsamına alınıp gruplar içerisinde rastgele dağıtıldı. Bu çalışmada, sağlıklı koyunlar Grup 1 (n=7) ve Grup 2 (n=7) olmak üzere iki guruba ayrıldı. Grup 1' deki koyunlara flunixin meglumine 2.2 mg/kg/gün dozunda intramusküler, Grup 2' deki hayvanlara da meloksikam 0.5 mg/kg/gün dozunda subkutan olarak ilk 3 gün boyunca uygulandı. Her iki gruptaki hayvanların koagülasyon profillerinin [protrombin zamanı (PT), aktive edilmiş tromboplastin zamanı (APTT), fibrinojen (FIB) konsantrasyonu] ve trombosit (PLT) sayımının belirlenebilmesi için vena jugularis'den 0. saat, 3. saat, 6. saat, 12. saat, 24. saat, 2. gün, 3. gün, 6. gün, 12. gün ve 24. günde kan örnekleri sodyum sitratlı ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)' lı tüplere 2' şer ml alındı. Non-steroid antiinflamatuar ilaçlardan flunixin meglumine ve meloksikam ile tedavi edilen koyunlarda zamana bağlı olarak FIB ve PLT konsantrasyonlarında azalma, PT seviyelerinde ise zamanın olduğu ve bu değişikliklerin istatistiksel açıdan önemli olduğu belirlendi. Gruplar arasında hemostatik değişiklikler açısından istatistiksel olarak belirgin bir farkın olmadığı belirlendi. Sonuç olarak NSAİİ' lardan flunixin meglumine ve meloksikam ile tedavi edilen koyunlarda konvansiyonel rutin hemostatik değişikliklerden FIB, PLT, PT, düzeylerinin dikkatle takibi alınması kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Flunixin meglumine, Koagülasyon profili, Koyun, Meloksikam, Trombosit.

Investigation of the Effects of Flunixin Meglumine and Meloxicam Administration on Coagulation Profiles in Healthy Sheep

Abstract: In this study, it was aimed to investigate the effects of flunixin meglumine and meloxicam application on coagulation profile in healthy sheep. Animals with physical examination findings and hemogram and biochemical data within physiological limits were included in the study and randomly distributed among the groups. Healthy sheep were divided into two groups, Group 1 (n=7) and Group 2 (n=7). In this study, groups 1 and 2 were given intramuscular injections of flunixin meglumine at a dose of 2.2 mg/kg/day and subcutaneous injections of 0.5 mg/kg/day of meloxicam for the first 3 days. 0 hours, 3 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours from vena jugularis to determine the platelet count [prothrombin time (PT), activated thromboplastin time (APTT), fibrinogen (FIB) concentration] and platelet (PLT) count of coagulation profiles of animals in both groups on day 1, day 2, day 3, day 6, day 12 and day 24 blood samples were taken with sodium citrate and 2 µl of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA). NSAIDs were found to have a significant decreases in FIB concentrations and PLT counts, prolonged PT levels in sheep treated with flunixin and meloxicam. There was no statistically significant difference in hemostatic changes between the groups. In conclusion, it was concluded from the NSAIDs that flunixin meglumine and meloxicam treated sheep were carefully followed by conventional routine hemostatic changes of PLT, PT, FIB levels.

Keywords: Coagulation profile, Flunixin meglumine, Meloxicam, Sheep, Thrombocyte.

✉ Sedat PAŞA

Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Aydın, TÜRKİYE.
e-posta: pasaserdar@yahoo.co.uk

*Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi tarafından VTF-16020 ile yüksek lisans tezi olarak desteklenmiştir.

GİRİŞ

Nikotinik asit türevi non-steroid antienflamatuar (NSAİİ) ilaçlardan flunixin meglumin aneljezik, antipiretik ve inflamasyon önleyici etkileri olan bir ilaçtır. Aneljezik etkisini, duyarlı ağrı reseptörlerini mekanik ya da kimyasal yolla uyaran maddeleri bloke edip prostoglandin sentezini durdurarak ağrı impulslarını bloke etmesi ile sağlar. Flunixin meglumin çeşitli hayvan türlerinde genel olarak hipertermide, iskelet-kas sistemi inflamasyonunda, endotoksemi ile ilişkili yangılarda, iç organlarda düz kas kasılmaları sonucu ortaya çıkan ağrılarda ve septisemide kullanılmaktadır (1,2).

Oksikam grubu enolik asit türevi olan meloksikam NSAİİ grubu bir ilaçtır. Ağrı kesici, yangı önleyici ve ateş düşürücü etkilerini seçici olarak COX-2 enzimini bloke ederek gösterir. Seçici olarak COX-2 enzimini inhibe eden meloksikam COX-2 enzimi için spesifik değildir. İlaç tedavi edici dozlarda kullanıldığı zaman COX-2 enzimini seçici olarak inhibe ettiği ancak doz aşımı durumunda ise bu seçiciliğinin azaldığı bildirilmiştir (3).

Non-steroid antienflamatuar olan bu ilaçların özellikle kronik ortopedik ağrıların giderilmesinde yaygın bir şekilde kullanıldığı ancak gastrointestinal sistem başta olmak üzere, karaciğer, böbrek ve trombosit agregasyonları ve koagülasyon profillerine olan etkileri göz önüne alındığında tekrarlayan uygulamaların da dikkatli olunması gerektiği belirtilmektedir (4). Yapılan literatür incelemelerinde köpeklerde farklı NSAİİ kullanımı ile ilişkili rutin konvansiyonel hemostatik değişimlerin belirtildiği çalışmalara rastlanmakta iken (5,6) ruminant hekimliğinde özellikle de koyunlarda söz konusu ilaçların değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Bu çalışmada, koyunlarda enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz birçok hastalıkta kullanım alanı bulan Flunixin meglumine ve meloksikamın koagülasyon profili üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Araştırmanın hayvan materyalini Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Koyunculuk

ünitesinde bulunan 12-14 aylık yaşta 30-40 kg canlı ağırlığa sahip klinik ve laboratuvar muayene (tam kan sayımı ve serum biyokimyasal bulgularına) bulguları ışığında sağlıklı olduğu belirlenen karyalı 14 koyun oluşturdu. Hayvanların çalışma süresince besleme rejimleri değiştirilmeden toplam karışım rasyonu ve adlibitum su ile bakım yönetimleri sağlandı. Söz konusu araştırma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyle Yerel Etik Kurulu' nun 64583101/2016/77 nolu izni ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışma Dizaynı ve Örneklerin Alınması

Çalışma kapsamına alınan hayvanlar flunixin meglumine ve meloksikam uygulamalarının yapılacağı (n=7) şekilde rastgele örnekleme yöntemi ile 2 gruba ayrıldı. Grup 1'deki hayvanlara flunixin meglumine 2.2 mg/kg/gün dozunda intramusküler, Grup 2'deki hayvanlara ise meloksikam 0.5 mg/kg/gün dozunda subkutan ilk 3 gün boyunca (24 saat ara ile) uygulandı. Her iki gruptaki hayvanların koagülasyon profillerinin [protrombin zamanı (PT), aktive edilmiş tromboplastin zamanı (APTT), fibrinojen (FIB) konsantrasyonu] ve trombosit (PLT) sayımının belirlenebilmesi için vena jugularis'den 0.saat, 3.saat, 6.saat, 12.saat, 24.saat, 2.gün, 3. gün, 6. gün, 12.gün ve 24.günde kan örnekleri sitratlı ve EDTA' lı tüplere 2' şer ml alındı.

Sodyum sitratlı tüplere alınan kan örnekleri kan alımı işlemi takiben 3000 devir / dk' da santrifüj edilip PT, APTT ve FIB konsantrasyonları mikrokoagülometre (Fineware, Wondfo Biotech, Çin Beijing Precil) ile ölçüldü. EDTA' lı tüplere alınan kan örneklerinde ise PLT sayıları tam kan sayım cihazı (Coulter –Abacus Junior Vet, Macaristan) ile ölçüldü.

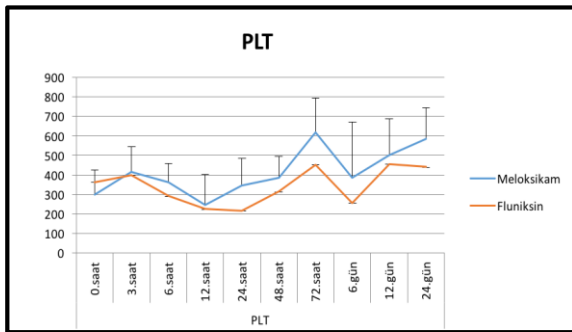
İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen sayısal verilerin tanımlayıcı istatistikleri ve homojenite testleri Shapiro Wilk analizine göre belirlendikten sonra normal dağılım göstermeyen verilere logaritmik transformasyon işlemi gerçekleştirildi. Meloksikam ve Flunixin meglumine uygulanan gruplardaki grup, zaman ve grup zaman ilişkisi açısından istatistiksel

farklılıkların belirlenmesi için parametrik testlerden Tekrarlayan Ölçümler Varyans Analizi (ANOVA)'nden yararlandı. Elde edilen istatistiksel sonuçlar non-parametrik Kruskal-Wallis (ikili etkileşimler) testi sonuçları ile karşılaştırılarak sağlamaları yapıldı. Tüm istatistiksel analizlerde SPSS (Anonymous, Statistcs 22) paket programı kullanılarak $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Flunixin meglumine (Grup I) ve meloksikam (Grup II) uygulanan gruplarda PLT sayısındaki değişimlerin grup ve grup-zaman ilişkisi açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığı ancak zaman ilişkisi açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunduğu belirlendi. Grup I' deki hayvanların PLT sayısı 3. saate (398.00 ± 182.05 mg/dl) göre 24. saatte (215.57 ± 107.24 mg/dl), benzer şekilde 72. saate (453.14 ± 198.18 mg/dl) göre 6. günde de (255.42 ± 132.11 mg/dl) düştüğü ve bu azalışların istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur. Grup II' deki hayvanların PLT sayısı 3. saate (414.28 ± 129.12 mg/dl) göre 12. saatte (244.28 ± 159.02 mg/dl), benzer şekilde 72. saate (618.14 ± 175.54 mg/dl) göre 6. günde de (383.57 ± 287.90 mg/dl) düştüğü ve bu azalışların istatistiksel olarak önemli düzeyde anlamlı olduğu bulunmuştur (Şekil 1).

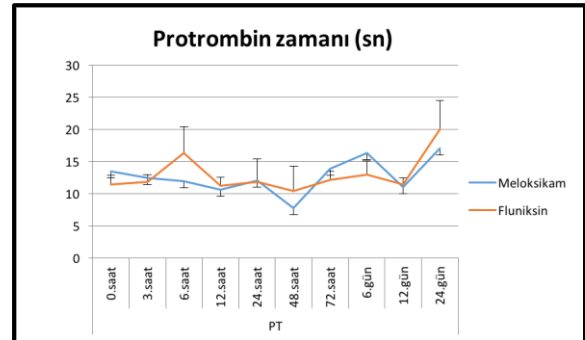


Şekil 1. Gruplarda trombosit sayılarının zamana bağlı değişimleri.

Figure 1. Time related changes of trombocyte counts in groups.

Her iki uygulama grubunda bulunan hayvanların protrombin zamanlarında da trombosit sayılarına benzer şekilde grup ve grup-zaman ilişkisi açısından

istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığı ancak zaman ilişkisi açısından şekillenen değişimlerin istatistiksel anlamlı olduğu belirlendi. Flunixin meglumine uygulanan Grup I deki hayvanların PT' nin uygulama öncesine göre (11.37 ± 1.49 sn) 6. saat ölçümlerinde (16.46 ± 3.71 sn) istatistiksel düzeyde uzadığı belirlendi. Söz konusu grupta ki hayvanların PT'nin uygulama öncesi 0. saate (11.37 ± 1.49 sn) göre 24. günde (19.98 ± 4.50 sn) ve 12. gün (11.41 ± 0.99 sn) ile 24. gün (19.98 ± 4.50 sn) arasındaki ölçümlerinde istatistiksel anlamda uzamaların olduğu tespit edildi. Meloksikam uygulanan Grup II' de bulunan hayvanlar da PT'de ilk 24 saate kadar zamana bağlı istatistiksel anlamlı değişimlerin bulunmadığı, 24. saatte ölçülen (12.01 ± 7.20) seviye ile 48. saat ölçümleri (7.70 ± 0.67) arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmanın olduğu belirlendi. Söz konusu gruptaki 48. saat ölçümü (7.70 ± 0.67) ile 6. gün arasında yapılan ölçümde (16.31 ± 4.25) PT' de belirgin bir artışın olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (Şekil 2).

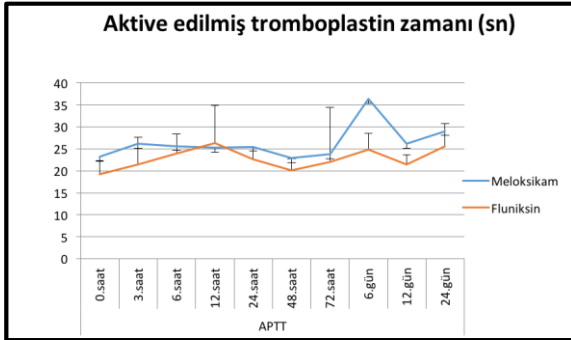


Şekil 2. Gruplarda Protrombin süresinin zamana bağlı değişimleri.

Figure 2. Time related changes of Protrombine time in groups.

Flunixin meglumine ve meloksikam gruplarında APTT'deki değişimler değerlendirildiğinde grup, zaman ve grup-zaman ilişkisi açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığı belirlendi. Flunixin meglumine uygulanan grupta ki hayvanlarda APTT' nin uygulama öncesi 0. saate (19.28 ± 2.98 sn) göre 12. saatte (26.31 ± 8.63 sn), benzer şekilde 48. saate (20.11 ± 2.68 sn) göre 6. günde de uzadığı (24.91 ± 3.55 sn) ancak bu değişimin istatistiksel olarak anlamlı

olmadığı belirlendi. Meloksikam uygulanan grupta ki hayvanlarda APTT'nin 0. saate (23.22 ± 5.32 sn) göre 3. saatte (26.15 ± 4.03 sn), benzer şekilde 72. saate (23.78 ± 6.27 sn) göre 6. günde de (36.35 ± 19.70 sn) uzama gösterdiği ancak bu değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi (Şekil 3).

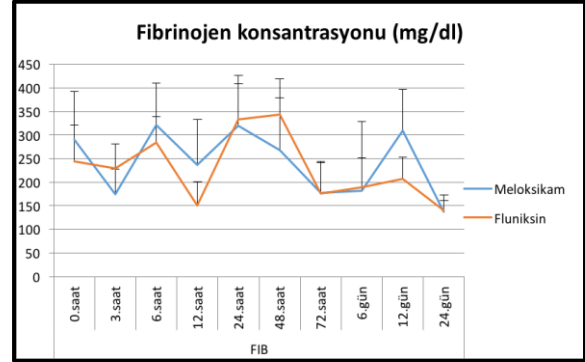


Şekil 3. Gruplarda Aktive edilmiş tromboplastin süresinin zamana bağlı değişimleri.

Figure 3. Time related changes in Activated tromboplastine time levels in groups.

Her iki uygulama grubunda da FIB konsantrasyonundaki değişimlerin grup ve grup-zaman ilişkisi açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığın bulunmadığı ancak zaman ilişkisi açısından istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılığın bulunduğu belirlendi. Fluniksın meglumin uygulanan grupta ki hayvanların FIB konsantrasyonları uygulama öncesine (244.09 ± 76.57 mg/dl) göre 3. saatte (228.92 ± 52.17 mg/dl), 6. saate (284.00 ± 55.09 mg/dl) göre 12. saatte (150.62 ± 51.1 mg/dl) ve 48. saate (667.51 ± 184.66 mg/dl) göre 72. saatte (176.37 ± 65.16 mg/dl) istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlendi. Benzer şekilde FIB konsantrasyonunun 12. güne (206.74 ± 45.89 mg/dl) göre 24. günde de (139.56 ± 21.86 mg/dl) düştüğü ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Meloksikam uygulanan grupta ki hayvanların FIB konsantrasyonları uygulama öncesine (290.55 ± 102.5 mg/dl) göre 3. saatte (174.21 ± 53.4 mg/dl), 6. saate (320.97 ± 89.65 mg/dl) göre 12. saatte (237.14 ± 96.47 mg/dl) ve 24. saate (320.37 ± 89.1 mg/dl) göre 72. saatte (177.7 ± 66.93 mg/dl) istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlendi. Benzer şekilde FIB konsantrasyonunun 12.

güne (309.54 ± 87.54 mg/dl) göre 24. günde de (137.24 ± 35.97 mg/dl) düştüğü ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Gruplarda Fibrinojen seviyelerinin zamana bağlı değişimleri.

Figure 4. Time related changes of Fibrinogen levels in groups.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Non-steroid antiinflamatuvar ilaçlar (NSAİİ) analjezik ve anti-inflamatuvar etkilerinden dolayı veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan ilaçlardır (7,8). NSAİİ' ler COX enziminin etkisini engelleyerek ya da ona bağlanarak prostoglandin üretimini bloke etmekte ve bunun sonucu olarak da ağrı kesici, ateş düşürücü ve yangı giderici etkilerini gösterirler (3). Bu ilaçların başlangıçta köpeklerin osteoarthritisinin tedavisinde, daha sonrada ruminant yetiştiriciliğinde gerek enfeksiyöz gerekse non enfeksiyöz metabolik hastalıkların önlenmesinde kullanım alanı bulunduğu rapor edilmiştir (9,10). Sığırlarda özellikle fluniksın meglumin solunum yolu hastalığı, endotoksik şok ve mastitis, atlarda kolik sağaltımında, koyunlarda mastitis ve gebelik toksemisinin önlenmesinde de kullanılan güçlü bir NSAİİ olarak kullanılmaktadır (9,11,12). Meloksikam oksikam grubu enolik asit türevi yangı önleyici bir ilaçtır. Analjezik, antiinflamatuvar ve antipiretik etkilerini seçici olarak COX-2 enzimini inhibe ederek gösterir. (3). Flunixin meglumine göre meloksikamın veteriner hekimlikte farklı hayvan türlerinde kullanılmasına yönelik daha sınırlı sayıda çalışmalar bulunmaktadır. NSAİİ' lerin kullanımı insanlardaki durumun aksine hayvanlarda yan etki olarak kardiyovasküler tromboemboli ve

miyokardiyal infarktusa yol açmadığı rapor edilmiştir (13). Flunüksin meglumin gibi NSAİİ' ler COX-1 enzimini inhibe ederek trombositlerin kümeleşmesini engellemekle birlikte, tromboksan A₂ sentezini de bloke ederek antitrombotik etkiye ve kanama süresinde uzamaya neden olabilirler (7). Hayvanlar arasında özellikle sağlıklı köpeklerde NSAİİ'lerin kullanılmasının hemostatik anormalliklerin değerlendirilmesi üzerine sınırlı sayıda çalışmalar literatürde yerini almasına rağmen koyunlarda NSAİİ'lerin kullanımının hemostaz üzerine etkinliğini bildiren çalışmaya rastlanılmamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda, NSAİİ'lerin kullanımının trombosit agregasyonunda azalma sonucu sistemik kanama eğiliminde artışa neden olabileceği rapor edilmiştir (10,14). Bu çalışmada, sağlıklı koyunlarda flunüksin meglumin ve meloksikam uygulamasının hemostatik değişikliklerden PLT, PT, APTT değerleri ve FIB konsantrasyonu üzerine etkileri değerlendirildi. İnsan ve köpeklerde NSAİİ'lerin hemostatik değişiklikler üzerine etkinlikleri rapor edilmesine rağmen koyunlarda sözü edilen bu ilaçların hemostaz üzerine etkinliğini gösteren bir literatür bilgisine rastlanılmamıştır. Trombosit sayısında azalma; yetersiz trombosit üretimi, immun sistemin tahribatı, trombosit tüketiminin artması, trombositlerin yaşam sürelerinin azalması, trombositlerin dalaktan ayrılması ve uygulanan ilaçlara bağlı oluşabilmekte ve buna bağlı olarak da mortaliteye neden olabilmektedir. (15-17). Veteriner alanda yapılan çalışmalarda, birçok kardiyovasküler ilaçların yanında NSAİİ'ler, kemoterapötik maddeler, antiviral ilaçlar, antikonvulsanlar, östrojenik bileşikler, antimikrobik maddelere bağlı olarak da trombositopeninin şekillenebildiği rapor edilmiştir (16,18,19). NSAİİ'ler COX enzimini inhibe ederek tromboksan A₂ oluşumunu engeller. Bu ilaçlar, tromboksana bağlı trombosit agregasyonunu bozarak sistemik bir kanama eğilimini predispoze ederek kanama süresinin uzamasına neden olur (20). Bu çalışmada, Flunüksin meglumin uygulanan grupta ki hayvanların PLT sayısı 3. saat (398.00 ± 182.05 mg/dl) ile 24. saat (215.57 ± 107.24 mg/dl) arasında, benzer şekilde 72. saat (453.14 ± 198.18 mg/dl) ile 6. gün (255.42 ± 132.11 mg/dl) arasında düştüğü ve bu azalmanın

istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, meloksikam uygulanan sağlıklı koyunlarda 3. saat (414.28 ± 129.12 mg/dl) ile 12. saat (244.28 ± 159.02 mg/dl) arasında ve 72. saat (618.14 ± 175.54 mg/dl) ile 6. günler (383.57 ± 287.90 mg/dl) arasında PLT sayısının istatistiksel olarak önemli düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Bu durum araştırmacıların bulgularıyla benzerlik göstermektedir (16,19-20).

Kanama temayülü olan insan ve hayvanlarda sekonder hemostazın değerlendirilmesinde PT ve APTT yaygın olarak kullanılan koagülasyon ölçüm parametrelerindedir (14). İnsan, domuz, rat, koyun ve köpek koagülasyon ölçümleri üzerine yapılan birçok çalışmada, koyun ve insan koagülasyon testleri arasında benzerlik olduğu rapor edilmiştir (21). Ayrıca, yapılan son çalışmalar koagülasyon bozuklukları için bir model olarak koyun kullanımını destekler niteliktedir. Bu çalışmada da koagülasyon profillerindeki benzerliklerden ve insan çalışmaları için model hayvan olarak kullanılmasından dolayı hayvan materyali olarak koyun seçilmiştir. İnsan ve koyun koagülasyonunda benzerlik olmasına rağmen, koyun sekonder hemostazı farklılıklar gösterdiğinden dolayı bu farklılıkların araştırılmasının gerekli olduğu bildirilmektedir (22). Nitekim sağlıklı farklı ırktaki koyunlarda koagülasyon testlerinden PT, APTT ve FIB düzeyleri üzerine yapılan çalışmalarda, PT' nin 14.7 ± 1.2 (23) ile 62±250 saniye, APTT'nin 29.2 ± 3.2 (24) ile 41.1± 8.7 saniye (25), FIB' in ise 3.7 ± 1.1 ile 4.4 ± 0.6 g/L (25) arasında olduğu rapor edilmiştir (21).

Kanama temayülünün belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, karprofen verilen köpeklerde sağaltım öncesine göre sağaltım sonrası 5. 7. ve 12. günlerde APTT değerlerinde önemli düzeyde artışın olduğu belirlenmiştir (14). Diğer bir çalışmada ise doksisisiklin, amoksisilin, sefaleksim ve enrofloksasin uygulanan köpeklerde PT ve APTT süresinin hafif düzeyde uzadığı tespit edilmiştir (26). Bu çalışmada, PT değerlendirmelerinde tekrarlayan flunüksin meglumin uygulamasının meloxicam grubunda bulunan hayvanlara kıyasla, 12. saat ile 12. gün arasındaki sürede istatistiksel anlamlı değişimlere neden olmadığı belirlendi. Ancak meloksikam grubunda bulunan koyunların 24. saatteki 2.

uygulamadan sonraki 48. saatlik ölçümlerinde PT'de önemli düzeyde azalmanın olduğu benzer azalmaların flunixin grubunda bulunan koyunlarda istatistiksel önem taşımadığı ve meloksikam grubuna göre daha düşük seviyede olduğu belirlendi. Bu durumun NSAİİ olan meloksikam'ın seçici COX-2 enzim inhibisyonu özelliklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, 3 defa flunixin meglumini uygulanan koyunlarda APTT'nin uygulama öncesi 0. saate göre 12. saatte ve 48. saate göre 6. günde de uzadığı; benzer şekilde meloksikam uygulanan koyunlarda 3 günlük uygulama sonucunda belirli zaman dilimlerinde de APTT değerlerinde uzamaların görüldüğü, ancak bu değişimlerin istatistiksel düzeyde önemli olmadığı belirlenmiştir. Bu durum araştırmacıların NSAİİ'lerin farklı türdeki hayvanlarda uygulanmasıyla elde edilen bulgularla benzerlik göstermektedir (10).

Glikoprotein yapısındaki FIB, karaciğer tarafından sentezlenir ve kan koagülasyonu sırasında trombin tarafından fibrine dönüştürülür (27). Pıhtılaşma kaskadındaki en önemli faktörlerden biri olan plazma FIB konsantrasyonu enfeksiyonlar, hemodinamik bozukluklar, kardiyak, akciğer ve aortik hastalıklar ve maligniteler gibi klinik bozukluklarda akut faz reaksiyonu olarak yükselebilir (28). FIB düzeyleri üzerine NSAİİ'lerin etkilerinin belirlenmesine yönelik veteriner alanda yapılan çalışmaların sayısının az olduğu rapor edilmiştir (10, 14). Nitekim kanama eğiliminin belirlenmesine yönelik yapılan bir çalışmada, meloksikam uygulanan sağlıklı köpeklerde FIB konsantrasyonunda önemli düzeyde bir azalmanın olduğu ancak bu azalmanın referans değerleri arasında olduğu rapor edilmiştir. Bu durum NSAİİ'lerin uygulanmasının COX inhibisyonunu engellemesiyle ilişkilendirilmektedir (10). Yapılan diğer bir çalışmada ise, sağlıklı köpeklere karprofen uygulamasını takiben FIB konsantrasyonunda önemli bir değişikliğin oluşmadığı tespit edilmiştir (14).

Bu çalışmada, FIB konsantrasyonlarının değerlendirilmesinde flunixin meglumini ve meloksikamın tekrarlayan uygulamalarının farklı zaman aralıklarında azalmalara neden olduğu belirlendi. Flunixin meglumini ilk uygulamasını

takiben 3. saat (228.92 ± 52.17 mg/dl) ve 12. saatte (150.62 ± 51.1 mg/dl) uygulama öncesi 0. saat (244.09 ± 76.57 mg/dl) değerlere kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi. İkinci doz (24. saat) uygulama ile 48. saatteki son uygulamaya bakıldığında flunixin meglumini FIB düzeyleri üzerine anlamlı bir değişim meydana getirmediği görüldü. Ancak 48. saatteki 3. doz uygulamadan sonra FIB düzeyinin (343.85 ± 75.11) anlamlı bir şekilde azaldığı ve çalışmanın son gününe kadar ılımlı değişimler ile benzer seviyelerde seyir ettiği belirlendi. Meloksikam uygulama grubunda bulunan hayvanların FIB düzeylerindeki değişimlerin Flunixin meglumini uygulama grubuna göre benzer değişimler gösterdiği ancak 24. (320.37 ± 89.1 mg/dl) ve 48. saatte (177.7 ± 66.93 mg/dl) flunixin meglumini grubunda zaman bağlı istatistiksel önemi olmayan değişimin, meloksikam grubunda bulunan hayvanlarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı, bu azalmanın her iki grup arasında farklılık göstermediği belirlendi. Bu çalışmada, flunixin meglumini ve meloksikam uygulanan sağlıklı koyunların FIB konsantrasyonlarında ki azalma araştırmacıların çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir (10).

Sonuç olarak koyunlarda NSAİİ'lerin uygulanmasını takiben hemostatik değişimlerinin değerlendirildiği bu çalışmadan elde edilen bulguların söz konusu ilaçlar ile sağaltıma alınan koyunlarda konvansiyonel rutin hemostatik değişikliklerden PLT, PT, FIB düzeylerinin dikkatle takip edilmesi gerektiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

1. Monteiro-Steagall BP., Steagall PVM., Lascelles BDX., 2013. Systematic review of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced adverse effects in dogs. *J Vet Int Med* 27, 1011-1019.
2. Kumar R., 2015. Comparative evaluation of tolfenamic acid, Flunixin-meglumine and butorphanol in pain management in canine orthopaedic cases. Doctoral dissertation, LUVAS. Curry SL.,
3. Nandakishore R., Yalavarthi R., Kiran RP., Rajapranathi M., 2014. Selective cyclooxygenase

- inhibitors: current status. *Curr Drug Discov Techno*, 11, 127-132.
4. KuKanich B., Bidgood T., Knesl O., 2012. Clinical pharmacology of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in dogs. *Vet Anaesth Analg*, 39, 69-90.
 5. Brainard BM., Meredith CP., Callan MB., Budsberg SC., Shofer FS., Driessen B., Otto CM., 2007. Changes in platelet function, hemostasis, and prostaglandin expression after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory drugs with various cyclooxygenase selectivities in dogs. *Am J Vet Res*, 68, 251-257.
 6. Luna SP., Basilio AC., Steagall PV., Machado LP., Moutinho FQ., Takahira RK., Brandao CV., 2007. Evaluation of adverse effects of long-term oral administration of carprofen, etodolac, flunixin meglumine, ketoprofen, and meloxicam in dogs. *Am J Vet Res*, 68, 258-264.
 7. Mathews K., Kronen PW., Lascelles D., Nolan A., Robertson S., Steagall PV., Yamashita K., 2014. Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. *J Small Anim Pract*, 55, 10-68.
 8. Kaya S., 2006. Narkotik Olmayan Ağrı Kesiciler. S. Kaya Eds. In: *Veteriner Farmakoloji*. 4. Baskı., 295-320. Ankara: Medisan Yayınevi, Ankara.
 9. Coetzee JF., 2013. A review of analgesic compounds used in food animals in the United States. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 29, 11-28.
 10. Blois SL., Allen DG., Wood RD., Conlon PD., 2010. Effects of aspirin, carprofen, deracoxib, and meloxicam on platelet function and systemic prostaglandin concentrations in healthy dogs. *Am J Vet Res*, 71, 349-358.
 11. Attili AR., Prezioso S., Ngwa VN., Cantalamessa A., Moriconi M., Cuteri V., 2016. Clinical evaluation of the use of enrofloxacin against *Staphylococcus aureus* clinical mastitis in sheep. *Small Rum Res*, 136, 72-77.
 12. Zamir S., Rozov A., Gootwine E., 2009. Treatment of pregnancy toxemia in sheep with flunixin meglumine. *Vet Rec*, 29, 165, 265-266.
 13. Gentry PA., 2004. Comparative aspects of blood coagulation. *Vet J*, 168, 238-251.
 14. Zanuzzo FS., Teixeira-Neto FJ., Thomazini CM., Takahira RK., Conner B., Diniz MS., 2015. Effects of dipyron, meloxicam, or the combination on hemostasis in conscious dogs. *J Vet Emerg Crit Care*, 25, 512-520.
 15. Bulla C., Kiomi TR., Pessoa JR., Aparecida TL., Souza LR., Wiedmeyer CE., 2004. The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Vet Res*, 35, 141-146.
 16. Luba M., Gusarski I., 2005. Thrombocytopenia as a complication of nonsteroidal anti-inflammatory drug treatment. *Przegl Lek*, 62, 1556-1557.
 17. Herring J., McMichael M., 2012. Diagnostic approach to small animal bleeding disorders. *Top Companion Anim Med*, 27, 73-80.
 18. Zimmerman KL., 2000. Drug-induced thrombocytopenias. In: BF Feldman, JG Zinkl, NC Jain, eds. *Schalm's veterinary hematology*. 5th ed., 472-477., The Williams & Wilkins Company, Philadelphia.
 19. Brooks M., Catalfamo J., 2005. Platelet disorders and von Willebrand disease. In: SJ Ettinger, EC Feldman, eds. *Textbook of veterinary internal medicine*. 6th ed., 1918-1929, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
 20. Schafer AI., 1995. Effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on platelet function and systemic hemostasis. *J Clin Pharmacol*, 35, 209-219.
 21. Foley S., 2014. A comprehensive study of ovine haemostasis to assess suitability to model human coagulation. *Thromb Res*, 134, 468-473.
 22. Wilhelmi MH., Tiede A., Teebken OE., Bisdas T., Haverich A., & Mischke R., 2012. Ovine blood: establishment of a list of reference values relevant for blood coagulation in sheep. *ASAIO Journal*. 58, 79-82.
 23. Gajewski J., Povar ML., 1971. Blood coagulation values of sheep. *Am J Vet Res*, 32, 405-409.
 24. Tligui N., Ruth GR. 1994. *Ferula communis* variety *brevifolia* intoxication of sheep. *Am J Vet Res*, 55, 1558-1563.
 25. Osbaldiston GW., Hoffman MW., 1971. Blood coagulation valves in normal sheep and in two mutant strains with hyperbilirubinemia. *Can J*

- Comp Med 35, 150-154.
26. Webb JA., Allen DG., Abrams-Ogg AC., Gentry PA., 2006. Effects of doxycycline, amoxicillin, cephalixin, and enrofloxacin on hemostasis in healthy dogs. Am J Vet Res, 67, 569-576.
27. Everse SJ., Spraggon G., Veerapandian L., Riley M., Doolittle RF., 1998. Crystal structure of fragment double-D from human fibrin with two different bound ligands. Biochem, 37, 8637-8642.
28. Hajsadeghi S., Kerman SR., Khojandi M., Vaferi H., Ramezani R., Jourshari NM., Mousavi SA., Pouraliakbar H., 2012. Accuracy of D-dimer: fibrinogen ratio to diagnose pulmonary thromboembolism in patients admitted to intensive care units. Cardiovasc J Afr, 23, 446-456.



Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi

Selim ÇOMAKLI[✉], Yavuz Selim SAĞLAM¹, Mustafa ÖZKARACA¹, Serdar ALTUN¹

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

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
11.12.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Çomaklı S, Sağlam YS, Özkaraca M, Altun S: Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 309-316, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.364602

Öz: Bu çalışmada, Erzurum yöresinde yetiştirilen sığırların akciğerlerinde *Parainfluenza-3* (PI-3) etkeninin immunohistokimyasal olarak varlığının ve yaygınlığının araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Erzurum ilinde faaliyet gösteren kesimhanelerde kesimi yapılan 600 sığıra ait akciğer örneği toplanarak incelendi ve makroskopik olarak 75 (%12.5) akciğer örneğinde pnömoni bulgusuna rastlandı. Makroskopik olarak incelenen bu akciğerlerin histopatolojik incelemesinde 58 interstisyel pnömoni, 10 bronkointerstisyel pnömoni, 2 kataral bronkopnömoni, 2 fibrinli pnömoni ve 3 granümatöz pnömoni olgusu gözlemlendi. Pnömoni saptanan akciğer kesitlerine PI-3 virüsü yönünden immunohistokimyasal boyama yapıldı ve 7 (%9.33) akciğer örneğinde immunpozitiflikler belirlendi. İmmünpozitifliklere interstisyel pnömoni gözlenen 6 (%10.34), bronkointerstisyel pnömoni gözlenen 1 (%10) akciğer örneğinde rastlandı. PI-3 viral antijeni pozitif olan akciğerlerde immunpozitifliklere bronş ve bronşiyol epitellerinin sitoplazmasında, bronşiyol çevresindeki bronşyoalveolar lenfoid dokudaki (BALT) yangı hücrelerinde, alveollerde, interstisyel alandaki makrofajlarda rastlandı. Ayrıca bu pozitiflikler bronkointerstisyel pnömoni gözlenen akciğer örneklerinde bronşiyol lümenindeki yangısal eksudatta gözlemlendi. Sonuç olarak; Erzurum yöresindeki sığırlarda pnömoni oluşturan etkenler içerisinde PI-3 viral antijen varlığının önemli bir yere sahip olduğu belirlenmiş ve sığırlardaki solunum sistemi hastalık kompleksine karşı yapılan koruma ve tedavi yöntemlerinde bu etkenin göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: İmmunohistokimya, *Parainfluenza-3*, Pnömoni, Sığır.

The Determination of Parainfluenza-3 Viral Antigens Using Immunohistochemical Methods in Cattle Lungs in Erzurum Region

Abstract: The aim of this study was to investigate immunohistochemically the presence and the prevalence of *Parainfluenza-3* (PI-3) in the lungs of cattle breeding in the Erzurum region. For this aim, the lung samples of 600 cattle slaughtered in abattoirs in Erzurum province were examined by collecting and pneumonia was macroscopically observed in 75 (12.5%) lung samples. 58 interstitial pneumonia, 10 broncho-interstitial pneumonia, 2 catarrhal pneumonia, 2 fibrinous pneumonia, and 3 granulomatous pneumonia were observed in the histopathological evaluation of these lungs examined macroscopically. Immunohistochemical staining was performed to pneumonia detected lung sections in terms of PI-3 virus and immunopositivity was detected in 7 (9.33%) lung samples. Immunopositivity was observed in 6 (10.34%) interstitial pneumonia and 1 (10%) broncho-interstitial pneumonia in lung samples. Immunopositivity in the lungs which were positive for PI-3 viral antigens was found in the cytoplasm of bronchi and bronchioles epithelium, in inflammation cells in bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) around bronchioles, in the alveoli, in the macrophages in the interstitial area. Furthermore, these positivities were observed in the inflammatory exudate in the bronchial lumen in the broncho-interstitial pneumonia lung samples. In conclusion, it was determined that the presence of PI-3 viral antigens has an important place in agents which occur pneumonia in cattle in Erzurum region and it is thought that this agent should not be ignored in the protection and treatment methods against the bovine respiratory disease complex.

Keywords: Cattle, Immunohistochemistry, *Parainfluenza-3*, Pneumonia.

✉ Selim ÇOMAKLI

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: selim.comakli@atauni.edu.tr

GİRİŞ

PnömoniLER sığırlarda ekonomik kayıplara neden olan en önemli hastalıklar arasında yer alır (1-3). Bakteriyel, paraziter, mikoplazmal gibi etkenlerin yanında, viral etkenler de pnömoniye neden olabilmektedirler (4,5). *Bovine respiratory syncytial virus (BRSV)*, *bovine herpesvirus-1 (BoHV-1)*, *bovine viral diarrhoea virus (BVDV)*, *bovine coronavirus (BoCV)*, *bovine adenovirus*, *bovine enterovirus 1, 2, 3*, *bovine rinovirus 1 ve 2*, *bovine reovirus*'a ilave olarak *bovine parainfluenza-3 (PI-3)* virusta sığırlarda pnömoni sebebi olarak bildirilmiştir (6-10).

Paramyxoviridae ailesinde *Paramyxovirinae* alt ailesinin *Respirovirus* genusuna ait olan *PI-3* genç ve erişkin sığırlarda bilinen viral solunum sistemi patojenlerinin en önemlilerinden birisi olarak kabul edilir (11-15). Enfeksiyonun kaynağını sekresyonları ile çevreye virüs saçan *PI-3* ile enfekte hasta hayvanlar oluşturmaktadır. Bazı şiddetli olgularda intersitisyel pnömoni gözlenebilir (16). Sığırlarda primer viral enfeksiyonu sekonder bakteriyel enfeksiyonlar takip eder ve sonucunda ölüm şekillenebilir (17).

Parainfluenza-3 virus varlığının saptanmasında altın standart virüs izolasyon yöntemidir. Bunun yanında hemagglutinasyon testi (HA test), hemagglutinasyon inhibisyon testi (HI test), enzyme-linked immunsorbent assay (ELISA) testi ve direkt yada indirekt immunfloresan boyama, immunohistokimyasal boyama gibi bazı yöntemlerde virusun tespit edilmesinde kullanılmaktadır (18,19). Pnömoni akciğerlerde hematoksilen eozin boyama yöntemi ile *PI-3*'ün teşhisi yapılamadığından dolayı enfeksiyonun doğrulayıcı teşhisinin yapılabilmesi için enfekte hayvanların serum örneklerinden viral antijenlere karşı antikorların belirlenmesi ya da alt solunum yollarından immunohistokimyasal yöntemle etkenin belirlenmesi gereklidir (20-22).

Bu çalışmada; Erzurum yöresinde pnömoni sığır akciğerlerinde *Parainfluenza-3* viral antijen varlığının ve yaygınlığının immunohistokimyasal yöntemlerle tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışmada materyal olarak, 2014-2016 yılları arasında Erzurum ilinde kesimhanelerde kesimi yapılan 600 sığıra ait akciğer örneğinin makroskopik muayeneleri sonucunda pnömoni saptanan 75 sığır akciğer örneği incelendi (Etik Kurul Karar No: 2016/2).

Histopatolojik İnceleme

Alınan akciğer örnekleri %10' luk nötral formalin solüsyonunda tespit edilerek rutin alkol-ksilol takip sürecinden sonra parafin bloklara alındı. Dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı ve Hematoksilen-Eosin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi (23). Gözlenen mikroskopik bulgulara göre pnömoniler tanımlandı ve sınıflandırıldı (5).

İmmünohistokimyasal İnceleme

Bu amaçla polilisinli lamlara alınan 5 µm' lik kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildi. Kesitler PBS ile yıkandıktan sonra %3'lük H₂O₂' de 10 dk. tutularak endojen peroksidaz inaktivasyonu sağlandı. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için antijen retrieval solüsyonu ile 2x5 dk 500 watt' da muamele edildi. Daha sonra PBS ile yıkanan dokular Mouse anti-PI3 (Monoklonal antikor, Biox, Jemelle-Belçika, Bio290) ile 37° C de 1/100 dilüsyon oranında 30 dk. süreyle inkubasyona bırakıldı. İnkubasyon sonunda PBS ile yıkanan dokularda sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAP Detection IHC Kit (Abcam, Katalog no. ab80436) üretici firmanın önerdiği şekilde kullanıldı. Kromojen olarak 3,3 diaminobenzidine (DAB) kullanıldı. Yıkama sonunda Mayer's hematoksilen ile zit boyama yapıldı. Kesitler üzerine entellan damlatılarak ışık mikroskopunda (OLYMPUS BX51, OLYMPUS DP72-Kamera Ataçmanı, Japan) incelendi.

BULGULAR**Makroskobik Bulgular**

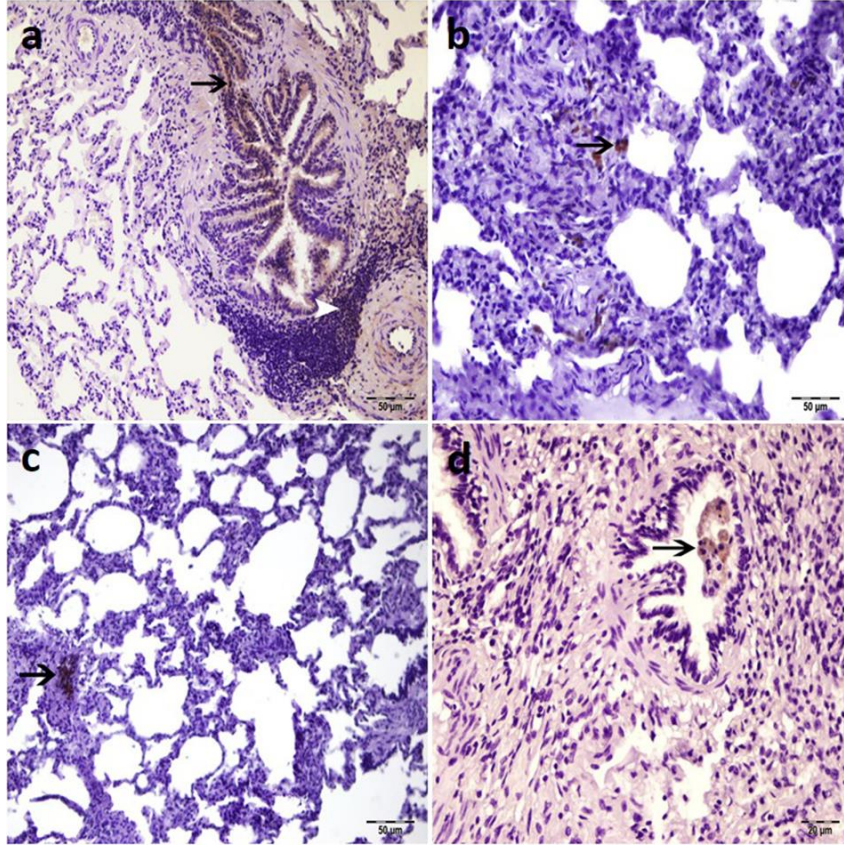
Makroskobik olarak incelenen 600 sığır akciğerinin 75'inde (%12.5) değişik tipte pnömoni bulgusuna rastlandı.

Histopatolojik Bulgular

Makroskobik olarak pnömoni saptanan akciğerlerin mikroskopik incelenmesi ile pnömonilerin tipleri belirlendi. Olguların 58'inde (%77.33) intersitisyel pnömoni, 10'unda (%13.33) bronkointersitisyel pnömoni, 2'sinde (%2.67) kataral bronkopnömoni, 2'sinde (%2.67) fibrinli pnömoni, 3'ünde (%4) granümatöz pnömoni tespit edildi.

İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal boyamada, *PI-3* viral antijenlerine 58 intersitisyel pnömoni özelliği gösteren akciğer örneğinin 6'sında, 10 bronkointersitisyel pnömoni gözlenen akciğer örneğinin 1'inde rastlandı. *PI-3* viral antijenine ilişkin spesifik boyanmalara bronş ve bronşiyol epitellerinin sitoplazmasında, bronşiyol çevresindeki BALT dokusunda (Şekil 1a), alveollerde (Şekil 1b), intersitisyel alanda makrofajlarda (Şekil 1c) ve bronkointersitisyel pnömoni olgusunda ise bronşiyol lümenindeki eksudatta rastlandı (şekil 1d).

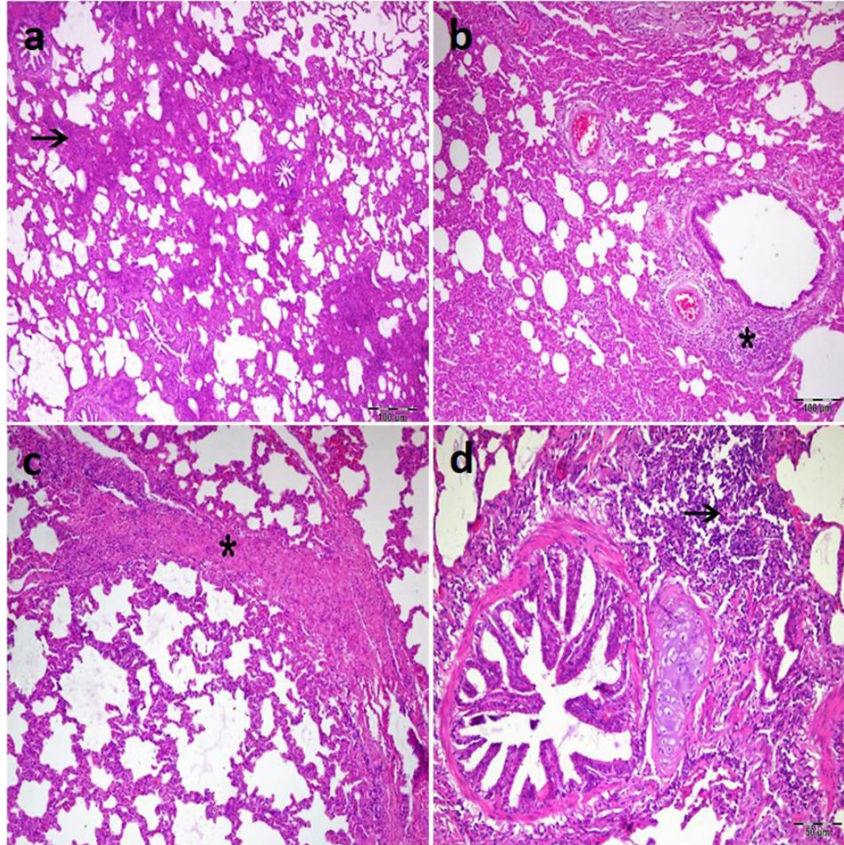


Şekil1: a) Bronşiyol epitelinin sitoplazmasında (ok) ve bronşiyol çevresindeki BALT dokusunda (ok başı) Parainfluenza-3 immunpozitiflikleri, b) Alveol duvarındaki immunpozitiflik (ok), c) İntersitisyel alandaki yangı hücrelerindeki immunpozitiflik (ok), d) Bronşiyol lümenindeki yangısal eksudat hücrelerinde immunpozitiflik (ok) & IHC.

Figure 1: a) Parainfluenza-3 immunopositivity in the cytoplasm of the bronchiol epithelium (arrow) and in the BALT tissue around the bronchiol (arrowhead), b) Immunopositivity on alveolar wall (arrow), c) Immunopositivity in inflammatory cells in the interstitial area (arrow), d) Immunopositivity in inflammatory exudate cells in bronchiol lümen (arrow) & IHC.

Parainfluenza-3 viral antijeni yönünden immunpozitiflik gösteren pnömonili akciğer örneklerinin mikroskopik incelemesinde, interalveoler septumlarda bağ doku artışı ve mononükleer hücre infiltrasyonlarına bağlı olarak kalınlaşmalar (Şekil 2a), peribronşiyal, peribronşiyoler lenfoid dokuda hiperplazi gözlemlendi (Şekil 2b). İnterlobuler septumlarda kalınlaşmalara rastlandı

(Şekil 2c). Bronş ve bronşiyol epitelinde yer yer hiperplazi tablosu gözlemlendi. BALT dokuda nekroz (Şekil 2d), bronş-bronşiyol çevresinde fibromusküler hipertrofi dikkati çekti. Bronkointersitisyel pnömonilerde bronş ve bronşiyol lümenlerinde eksudata rastlandı, bronş ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yer yer proliferasyona rastlandı.



Şekil2: a) İnteralveolar septumda kalınlaşma (ok), b) Bronşiyolar lenfoid dokuda hiperplazi (yıldız), c) İnterlobuler septumda kalınlaşma (yıldız), d) Bronş çevresindeki lenfoid doku hücrelerinde nekroz (ok)&HE.

Figure2: a) Thickening in interalveolar septum (arrow), b) Hyperplasia in bronchiolar lymphoid tissue (star), c) thickening of the interlobular septum, d) Necrosis in lymphoid tissue cells around the bronchus (arrow)&HE.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Sığırlarda solunum sistemi enfeksiyonları sıklıkla şekillenmektedir. Bu enfeksiyonlara neden olan *PI-3* etkeni hayvanlarda oluşturmuş olduğu ağırlık kaybı ve buna bağlı olarak meydana getirdiği verim düşüklüğü ile önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (24). *PI-3' ün* doğal ya da deneysel olarak oluşturulan solunum sistemi enfeksiyonlarında

patojen bir etkiye sahip olmadığı bildirilmiştir (25). Ancak bazı çalışmalarda *PI-3' ün* immun sistemin baskılanmasına bağlı olarak tek başına oluşturduğu enfeksiyonun şiddetinin, diğer etkenlerle birlikte oluşturduğu miks enfeksiyonlardan daha şiddetli olduğu bildirilmiştir (26). Etkenin teşhisinde histopatolojik olarak patognomonik bir bulgu bulunmamaktadır (27). *PI-3* etkeninin oluşturduğu

intersitisyel karakterdeki pnömonilerde, histopatolojik olarak alveol ve bronş epitellerinde dejenerasyon, alveol epitellerinde asidofilik intrasitoplazmik inklüzyon cisimciği, bronş ve alveol lümenlerinde lenfosit, nötrofil, makrofajlar ve dökülmüş alveol epitelleri ile sinsityal dev hücrelerine, lenfoid dokuda hiperplaziye ve nekrotik bronşiyolitise neden olduğu ve bronş çevresindeki lenfoid dokuda ise nekrozun bulunduğu ifade edilmiştir (28,29). Bu çalışmada *PI-3* viral antijeni belirlenen intersitisyel tip karakterdeki pnömonilerde önceki çalışmalarla benzer şekilde bronş ve bronşiyol epitellerinde dejenerasyon, deskuamasyon, lenfoid dokuda hiperplazi, bronş çevresindeki lenfoid dokuda nekroz tablosu gözlenmiştir. *PI-3* etkeninin oluşturmuş olduğu bronkointersitisyel pnömoniler histolojik olarak nekrotik bronşitis, bronşiyolitise, nötrofilik eksudat, bronşiyoller ve alveolar epitel hücrelerinde proliferasyon, sitoplazmik inklüzyon cisimciklerinin oluşumu ile karakterizedir (30). Sunulan çalışmada ise bronkointersitisyel pnömoni belirlenen akciğerlerin histopatolojik incelenmesinde, bronş ve bronşiyol lümenlerinde eksudat, bronş ve bronşiyol epitelinde nekroz ve yer yer proliferasyona rastlanmış olup, her iki pnömoni tipinde de inklüzyon cisimciği gözlenmemiştir. Deneysel *PI-3* enfeksiyonundan 7 gün sonra, intrasitoplazmik inklüzyonların seyrek olarak bulunması (4) sunulan çalışmada inklüzyon cisimciğinin gözlenmemesinin, alınan örneklerinin enfeksiyonun ilerleyen döneminde toplanmasından kaynaklanabileceğiyle ilişkilendirilmiştir.

Araştırmanın yapıldığı bölgede etkenin sığırlardaki varlığı ile ilgili daha önce Kuzeydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan çalışmada, sığırlardan alınan kan örneklerine yapılan nötralizasyon testi sonucunda %55.84 oranında seropozitiflik belirlenmiştir (31). Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yapılan diğer bir çalışmada da kan serumlarında nötralizasyon testi ile *PI-3* seropozitifliğinin %18 olduğu bildirilmiştir (32). Bu sonuçların ortaya çıkmasında enfeksiyon zamanı, enfeksiyonu oluşturan virusun dozu, çalışmada

kullanılan bireylerin yaşları, bakım ve beslenme koşulları gibi birçok faktör etkili olmaktadır (31).

Parainfluenza-3 ün teşhisinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PZR), hücre kültürü, direkt immunfloresan boyama, indirek immunfloresan boyama, immunohistokimya gibi tekniklerin önemli olduğu belirtilmiştir (27). Etkenin teşhisinde immunohistokimyasal yöntemin hızlı, güvenilir ve sensitivitesinin yüksek olduğu ifade edilmiştir (33). Sığır akciğerlerinde *PI-3* ün immunohistokimyasal yöntemlerle tanısına yönelik yapılan çalışmaların az sayıda olduğu görülmüştür (29,34).

Garcia ve ark. (35) *PI-3* etkeninin belirlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada intrasitoplazmik immunpozitifliklere %66.66 oranında rastlamışlardır. Aynı çalışmada *PI-3* immunpozitifliklerine 7 (%43.75) fibrinli plöropnömoni olgusunda, 2 (%12,5) suppuratif pnömoni olgusunda, 6 (%37.5) bronkointersitisyel pnömoni olgusunda rastlanmış, ancak lenfoproliferatif özellikteki pnömoni olgularında *PI-3* immunpozitifliklerine rastlamamışlardır. Çeribaşı ve ark. (29) sığır pnömonilerinin IHC yöntemi ile saptanması üzerine Elazığ ve yöresinde yapmış oldukları bir çalışmada %6.88 oranında *PI-3* virus immunpozitifliği bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada ise IHC yöntemi kullanılarak 58 intersitisyel pnömoni özelliği gösteren 6 (%10.34), bronkointersitisyel pnömoni gözlenen 1 (%10) akciğer örneğinde *PI3* etkenine ait immunpozitifliğe rastlanmıştır. Yapılan bu çalışmalarda ortaya çıkan farklı sonuçlar, kullanılan fiksatifin proteinleri denatüre ederek antijenik belirleyicileri maskeleyebileceği, dolayısıyla zayıf veya yetersiz bir cevaba neden olarak (35,36) immunpozitifliklerde farklı oranların ortaya çıkabileceği ile ilişkilendirilmiştir.

Haines ve ark. (34) frozen kesit ve parafin kesitlerde yaptıkları immunohistokimyasal boyamada bazı sitoplazmik inklüzyon cisimciği gözlenen hücrelerde yoğun boyamaya rastlamışlardır. Yine aynı çalışmada bronşiyol ve alveolar epitelin yüzeyinde sitoplazmik olarak boyanma gözlenmiştir.

Çeribaşı ve ark. (27) yaptıkları immunohistokimyasal bir çalışmada *PI3*'e ait immunpozitifliklere genellikle intrasitoplazmik olarak rastlamışlardır. İmmunpozitifliklerin bronşiyol ile alveol epitel hücrelerinde bulunduğunu ve immunpozitiflik yoğunluğunun bronşiyol epitel hücrelerinde alveol epitel hücrelerine göre daha şiddetli düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada bronş-bronşiyol ve kan damarlarının çevresindeki plazma hücreleri ve lenfositlerde immunpozitiflik gözlemiş, interalveolar septum, alveolar makrofaj, eksudat, ve alveolar epitelde immunpozitifliğe daha hafif rastlamışlardır. Yine bronşiyolle ilgili lenfoid dokuda da pozitiflikler bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da immunpozitifliklere bronşiyol epiteli, intersitisyel alandaki makrofajlarda, BALT dokusundaki makrofajlarda ve bronşiyol lümenindeki eksudatta rastlanmıştır. Bu anlamda etkenlerin dokudaki lokalizasyonu Haines ve ark. (34) ile Çeribaşı ve ark. (27) yapmış olduğu çalışmaya benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak; Erzurum yöresindeki sığır pnömonilerinde *PI-3* etkeninin %9.33 oranında bulunduğu ve sığır pnömonileri için dikkat edilmesi gereken etiyojik etkenlerden birisi olduğu belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. Brodersen BW., Kelling CL., 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhoea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am J Vet Res*, 59, 1423-1430.
2. Carriere PD., Maxie M., Wilkie B., Savan M., Valli V., Johnson J., 1983. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. *Can J Comp Med*, 47, 422-432.
3. Zhu YM., Yu Z., Cai H., Gao YR., Dong XM., Li ZL., Shi HF., Meng QF., Lu C., Xue F., 2011. Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China. *Virol J*, 8, 557.
4. Maxie M., Jubb K., 2007. Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed., 523-629, Saunders Elsevier, Philadelphia.
5. Zachary JF., Donald M., Gavin M., 2006. Pathologic basis of veterinary disease. 4th ed., 462-558, Elsevier Health Sciences, St. Louis, Missouri.
6. Fulton RW., 2009. Bovine respiratory disease research (1983–2009). *Anim Health Res Rev*, 10, 131-139.
7. Mosier D., 2015. Review of BRD pathogenesis: the old and the new. *Anim Health Res Rev*, 15, 166-168.
8. Taylor, J.D., Fulton RW., Lehenbauer TW., Step DL., Confer AW., 2010. The epidemiology of bovine respiratory disease: What is the evidence for predisposing factors? *Can Vet J*, 51, p. 1095-1102.
9. Taylor JD., Holland BP., Step DL., Payton ME., Confer AW., 2015. Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Res Vet Sci*, 99, 41-45.
10. Tuncer P., Yesilbag K., 2015. Serological detection of infection dynamics for respiratory viruses among dairy calves. *Vet Microbiol*, 180, 180-185.
11. Fauquet CM., Mayo MA., Maniloff J., Desselberger U., Ball LA., 2005. Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press.
12. Fulton RW., Purdy C., Confer AW., Saliki J., Loan RW., Briggs RE., Burge LJ., 2000. Bovine viral diarrhoea viral infections in feeder calves with respiratory disease: interactions with *Pasteurella* spp., parainfluenza-3 virus, and bovine respiratory syncytial virus. *Can J Vet Res*, 64, 151-159.
13. Mahony TJ., McCarthy FM., Gravel JL., West L., Young PL., 2002. Construction and manipulation of an infectious clone of the bovine herpesvirus 1 genome maintained as a bacterial artificial chromosome. *J Virol*, 76, 6660-6668.
14. Snowden G., Van Vleck LD., Cundiff L., Bennett G., Koohmaraie M., Dikeman M., 2007. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: phenotypic,

- environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *J Anim Sci*, 85, 1885-1892.
15. Fulton RW., Neill JD., Saliki JT., Landis C., Burge LJ., Payton ME., 2017 Genomic and antigenic characterization of bovine parainfluenza-3 viruses in the United States including modified live virus vaccine (MLV) strains and field strains from cattle. *Virus Res*, 235, 77-81.
 16. Maidana SS., Lomonaco PM., Combessies G., Craig MI., Diodati J., Rodriguez D., Parreño V., Zabal O., Konrad JL., Crudelli G., 2012. Isolation and characterization of bovine parainfluenza virus type 3 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in Argentina. *BMC Vet Res*, 8, 83.
 17. Oem JK., Lee EY., Lee KK., Kim SH., Lee MH., Hyun BH., 2013. Molecular characterization of a Korean bovine parainfluenza virus type 3 isolate. *Vet Microbiol*, 162, 224-227.
 18. Murphy FA., Gibbs EPJ., Horzinek MC., Studdert MJ., 1999. *Veterinary Virology*, 3rd ed., San Diego, Academic Press, Inc.
 19. Yang Y., Wang FX., Sun N., Cao L., Zhang SQ., Zhu HW., Guo L., Cheng SP., Wen YJ., 2015. Development and evaluation of two truncated recombinant NP antigen-based indirect ELISAs for detection of bovine parainfluenza virus type 3 antibodies in cattle. *J Virol Methods*, 222, 47-54.
 20. Gülbahar Y., Çabalar M., Ertürk A., 2002. Detection by immunoperoxidase technique of parainfluenza type-3 virus and respiratory syncytial virus antigens in naturally occurring pneumonia in lambs. *YYU Vet Fak Derg*, 13, 74-77.
 21. Radostits O., Blood D., Gay C., 1994. *Veterinary Medicine Textbook of the Disease of Cattle, Sheep, Goats and Horses*. 8th ed., Balliere Tindall, London.
 22. Yener Z., Sağlam YS., Timurkaan N., İlhan F., 2005. Immunohistochemical detection of parainfluenza type 3 virus antigens in paraffin sections of pneumonic caprine lungs. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 52, 268-271.
 23. Presnell JK., Schreibman MP., 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. 5th ed., Baltimore and London, Johns Hopkins University Press.
 24. Martin W., 1996. Respiratory infections of sheep. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 19, 171-179.
 25. Bryson D., McNulty M., Ball H., Neill S., Connor T., Cush P., 1979. The experimental production of pneumonia in calves by intranasal inoculation of parainfluenza type III virus. *Vet Rec*, 105, 566-573.
 26. Ghram A., Reddy P., Morrill J., Blecha F., Minocha H., 1989. Bovine herpesvirus-1 and parainfluenza-3 virus interactions: clinical and immunological response in calves. *Can J Vet Res*, 53, 62-67.
 27. Çeribası S., Özkaraca M., Özer H., Çeribası AO., 2012. Prevalence of parainfluenza type 3 virus antigens in pneumonic caprine lungs by direct immunofluorescence and immunoperoxidase techniques. *Small Rumin Res*, 108, 127-132.
 28. Aly N., Shehab G., El-Rahim I., 2003. Bovine viral diarrhoea, bovine herpesvirus and parainfluenza-3 virus infection in three cattle herds in Egypt in 2000. *Rev Sci Tech*, 22, 879-892.
 29. Ceribası AO., Ozkaraca M., Ceribası S., Ozer H., 2014. Histopathologic, immunoperoxidase and immunofluorescent examinations on natural cattle pneumonia originated from Parainfluenza type 3, Respiratory Syncytial virus, Adenovirus type 3 and Herpesvirus type 1. *Rev Med Vet*, 165, 201-212.
 30. Dungworth DL., 1993. Respiratory system, in *Pathology of Domestic Animals*, Ed. Jubb K., Peter K., Palmer N., 4th ed., 539-698, Academic Press, San Diego, CA.
 31. Yıldırım Y., Yılmaz V., Majarashin ARF., 2009. Kuzeydoğu Anadolu Bölgesi Sınır İllerinde Bulunan Sığırlarda Viral Solunum Sistemi Enfeksiyonlarının Seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15, 601-606.
 32. Çabalar M., Can-Şahna K., 2000. Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgesinde süt sığırlarında Parainfluenza Virus -3, Bovine Herpes Virus -1 ve Respiratory Syncytial Virüs Enfeksiyonlarının Seroepidemiolojisi. *YYU Vet Fak Derg*, 11, 101-105.
 33. Haines DM., Chelack BJ., 1991. Technical considerations for developing enzyme

- immunohistochemical staining procedures on formalin-fixed paraffin-embedded tissues for diagnostic pathology. *J Vet Diagn Invest*, 3, 101-112.
34. Haines DM., Kendall JC., Remenda BW., Breker-Klassen MM., Clark EG., 1992. Monoclonal and polyclonal antibodies for immunohistochemical detection of bovine parainfluenza type 3 virus in frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *J Vet Diagn Invest*, 4, 393-399.
35. Barranco FJ., Tavera FJT., Gris GC., Garcia REV., 2003. Viral participation in respiratory disease in feedlot cattle, as identified by immunohistochemistry. *Vet Mexico*, 34, 1-12.
36. Vanda CB., Valero EG., 1997. Inmunohistoquímica diagnostica. Memorias del Curso sobre Inmunohistoquímica. 1997 junio 25, Mexico (DF). Mexico (DF), Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios.



Dişi Köpeklerde İdrar Kesesi Hastalıklarının Radyografik, Ultrasonografik ve Endoskopik Yöntemlerle Belirlenmesi

Nusret APAYDIN¹, Hüseyin ERMİN²

1. Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Kayseri, TÜRKİYE.
2. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
22.01.2018	04.04.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Apaydın N, Ermin, H: Dişi Köpeklerde İdrar Kesesi Hastalıklarının Radyografik, Ultrasonografik ve Endoskopik Yöntemlerle Belirlenmesi. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 317-325, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.382461

Öz: Bu çalışmanın amacı dişi köpeklerde idrar kesesi hastalıklarının radyografik, ultrasonografik ve endoskopik yöntemler uygulanarak belirlenmesi, bu yöntemlerin karşılaştırmalarının yapılarak avantaj ve dezavantajlarının saptanmasıdır. Çalışmanın materyalini; Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine idrar kesesi hastalığı şüphesi ile getirilen değişik yaş ve ırkta 25 sahipli dişi hasta köpek oluşturdu. Bütün olgularda radyografik, ultrasonografik ve endoskopik yöntemlerle muayeneler yapılarak hastalıklarının kesin tanısı konuldu ve bulgular kaydedildi. Radyografide %64, ultrasonografide %96, endoskopide ise %100 başarı elde edildi. Sonuç olarak; dişi köpeklerde idrar kesesi hastalıklarının kesin tanısında endoskopi ve ultrasonografinin radyografiye göre daha avantajlı ve başarılı olduğu saptandı. Radyografinin tek başına yeterli olmadığı, ancak kesin tanı için destekleyici bir yöntem olabileceği belirlendi. Ultrasonografinin ise kesin tanı için yeterli olabileceği, ancak diğer metotlarla desteklenmesi gerektiği gözlemlendi. Endoskopinin tek başına kullanılabilmesi ve kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir görüntüleme yöntemi olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Endoskopi, İdrar kesesi, Köpek, Radyografi, Ultrasonografi.

Determination of Methods Radiographic, Ultrasonographic and Endoscopic of Urinary Bladder Diseases in Female Dogs

Abstract: The aim of this study was determination of the urinary bladder diseases on female dogs with radiographic, ultrasonographic and endoscopic methods and comparison and determination of advantages and disadvantages of these methods. The material of study consisted of 25 owned female dogs with different ages and races who were admitted to Erciyes University Veterinary Faculty clinics with the suspicion of urinary bladder diseases. In all cases, radiographic, ultrasonographic and endoscopic examinations were performed and the definitive diagnosis was made and findings were recorded. The success was achieved in 64% of the radiography, 96% of the ultrasonography and 100% of the endoscopy. As a result, it was found that endoscopy and ultrasonography were more advantageous and successful than radiography in definitive diagnosis of urinary bladder diseases. Radiography alone was not sufficient but it could be a supportive method for definite diagnosis. It was observed that ultrasonography may be sufficient for definite diagnosis but it should be supported by other methods. The endoscopy as a non-invasive and convenient imaging method can be used alone.

Keywords: Bladder, Dog, Endoscopy, Radiography, Ultrasonography.

GİRİŞ

İdrar kesesi alt üriner sistemin önemli organlardan biridir. Hastalıklarının tanısında direkt radyografi, indirekt radyografi ve ultrasonografiden yararlanılır (1). Ancak radyografi ve ultrasonografi tek başına yeterli bilgileri sağlayan bir tanı yöntemi değildir. Bununla birlikte üriner sistem hastalıklarının tanısında endoskopik yöntemlerden de yararlanılmaktadır (2-4).

Radyografi; intra-abdominal kitlesel lezyonların tanısında kullanılan ucuz ve uygulama açısından kolay olan görüntüleme yöntemlerinden biridir. İdrar kesesinin radyografik incelemesi direkt ve indirekt olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilir. İdrar kesesinde indirekt radyografide ise idrar kesesinin değerlendirilmesi 3 temel yöntem ile yapılır. Bunlar pozitif kontrast sistografi, negatif kontrast sistografi ve çift kontrast sistografidir (5-7).

Ultrasonografi; intra-abdominal kitlesel lezyonların değerlendirilmesinde ideal bir tanı yöntemi olarak kabul edilir. Ultrasonografide herhangi bir iyonize ışın yayılımı olmaksızın ve sedasyona ihtiyaç duyulmaksızın hayvanın muayenesi gerçekleştirilebilir (8,9). Ultrasonografi ile abdominal yapıların boyutları, şekilleri, ekojeniteleri, pozisyonları ve içyapıları incelenebilir. Ultrasonografide sagittal, transversal ve frontal (coronal) diye bilinen üç önemli kesit yüzeyi vardır. İdrar kesesi ultrasonografisi için genellikle 3.5 veya 7.5 MHz frekanslı linear, konveks veya sektör problar gereklidir (9-11).

Minimal invaziv yapısı, kolay ve pratik olması, hızlı sonuç vermesi gibi önemli avantajlarından dolayı endoskopi ideal görüntüleme yöntemidir. Endoskopiler fleksible ve rijit olarak iki katogoriye ayrılır (3). Fleksible endoskop uzun, boşluklu, köşeli ve anatomik olarak tüp şekilli organların (gastrointestinal sistem alt solunum yolları ve erkek üriner sistem) muayenesinde kullanılır, rijit endoskop ise vücut boşluklarının (abdomen, toraks, eklem, ağız boşluğu vb.) muayenesinde kullanılmaktadır. Rijit endoskoplar Veteriner hekimlikte otoskopide,

rinoskopide, kolonoskopide ve dişi kedi ve köpeklerde sistoskopide kullanılmaktadır (3,12,13).

Sistoskopi idrar kesesinin içinin, üretranın ve üreter açıklıklarının görüntülenmesinde, alt üriner sistem hastalıklarının tanısında, idrar taşı çıkarmada ve ektopik üreter gibi hastalıklarının sağaltımında kullanılan minimal invaziv bir tanı ve tedavi yöntemidir (4,14-17). Sistoskopide üretraya girişte tekrarlanan manuplasyonların bölgede travmalara neden olabilmesi önemli bir komplikasyondur. Ayrıca, bu uygulamalarda olası enfeksiyonların önüne geçmek için kullanılan ekipmanın steril olmasına dikkat edilmelidir. Köpek ve kedilerde alt üriner sistem hastalıklarının tanısında sistoskopin son derece etkili, minimal invaziv teknik olduğu kanıtlanmıştır (3,4,17-19).

Bu çalışma; dişi köpeklerde idrar kesesi hastalıklarının radyografik, ultrasonografik ve endoskopik yöntemler uygulanarak belirlenmesini ve bu yöntemlerin karşılaştırmalarının yapılarak avantaj ve dezavantajlarının saptanmasını içermektedir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmayı idrar kesesi hastalıkları yönünden radyografik, ultrasonografik ve endoskopik muayenesi yapılan değişik yaş ve ırktaki 25 sahipli dişi hasta köpek oluşturdu. (Bu araştırma; ERÜ HADYEK 11.10.2010 tarih ve 10/90 nolu kararı ile yapıldı.)

Radyografi de Poskom® marka, PXP-40HF model, 35mA, portatif x-ray ve ultrasonografide SonoSite® marka, 180™ Plus model Ultrason cihazından yararlanıldı. Ultrason cihazına uygun Transduser 4-7 MHz'lik mikrokonveks prob kullanıldı. Endoskopik muayenelerde; Veteriner kullanım amaçlı rijit endoskopi düzeneği olan, Medamet® F-166 1CCD Endocam marka endoskopi aygıtı ve Medamet® T 905004 Model 250W Halojen Medikal Soğuk Işık kaynağı kullanıldı. Sistoskopik muayene; hasta köpeklere uygun değişik ebatlarda 0° - 30° önden görüşlü teleskop ve sistoskopik kılıflarla yapıldı.

Premedikasyon için Xylazine HCl (Alfazin®) ya da Medetomidin (Domitor®), indüksiyonda %10 luk Ketamin HCl (Alfamine %10®) inhalasyon anesteziinde ise İzofloran (Isofludem®) kullanıldı.

Olguların ilk olarak sağ latero-lateral (L/L) ve ventro-dorsal (V/D) pozisyonlarda diyaframdan pubise kadar tüm abdominal bölgeyi kapsayacak şekilde direkt radyografileri alındı. Bazı olgularda negatif kontrast sistografi, pozitif kontrast sistografi ve çift kontrast sistografi ile görüntü alındı.

İndirek radyografide; kontrast madde (Urografin) %0.9 sodyum klorür ile dilüe edilerek, 4-10 ml/kg dozunda kese içerisine verildi. Hemen sonra L/L ve gerekli durumlarda V/D radyografileri alındı. Çift kontrast sistografide, üretraya kateter yerleştirildikten sonra kese içerisinden enjektör yardımıyla idrar aspire edildi. Kese içerisine 0.5-1 ml/kg dozunda iyotlu kontrast madde verildikten sonra keseye dıştan masaj yapılarak ilacın dağılması ve mukozaya yapışması sağlandı. Daha sonra enjektör aracılığıyla hayvanın idrar kesesi büyüklüğüne göre 250-300 ml kadar steril oda havası (Enjektör pistonu çekilirken hava ateşten geçirildi.) verildi. Daha sonra hastaların L/L radyografileri alındı.

Radyografik muayenenin ardından abdominal ultrasonografiye geçildi. Hayvanlara ultrasonografik muayene süresince tranklizan, sedatif ve anestetik madde uygulanmadı. Muayene öncesi idrar

kesesine, uygun bir kateter yardımıyla serum fizyolojik verildi. Kateter uygularken idrar kesesi içerisine hava verilmemesine dikkat edildi. İdrar keselerinin büyüklüğü ve dolgunluğuna bağlı olarak 4-7 MHz'lik mikro konveks prob kullanıldı.

Endoskopik muayene için hastalara genel anestezi uygulandı. Olgulara vaginal spekulum yerleştirildi. Teleskop spekulum içerisinden ilerletildi ve spekulum hastadan uzaklaştırıldı. Orifisyum üretra'ya sistoskopun ucu yerleştirildi ve ilerletilerek idrar kesesine ulaşıldı. İdrar kesesi; taş, mukozanın bütünlüğü (ruptur), sistitis, tümör ve üreterlere ait olan patolojik yapılar yönünden değerlendirildi. Hastaların idrar kesesine ait patolojik bozuklukları kaydedildikten sonra idrar kesesi içeriği tamamen boşaltıp endoskopik muayeneye son verildi.

İstatistiksel Analiz

Yöntemler arasındaki istatistiksel benzerlik, Cochran's Q testi ile test edildi.

BULGULAR

Yapılan klinik muayeneyi takiben sırasıyla radyografik, ultrasonografik ve endoskopik incelemeler yapıldı. Verilerin toplanması ve kayıtların derlenmesi sonucunda hastalıkların kesin tanısı konuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Görüntüleme yöntemlerinin hastalık türlerine göre dağılımı.

Table 1. Distribution of imaging methods according to diagnosis of diseases.

Hastalıkların Tanısı	Olgu Sayısı	Radyografik Tanı		Ultrasonografik Tanı	Endoskopik Tanı
		Direkt Radyografik Tanı	İndirekt Radyografik Tanı		
Kalkulus	9	9 +	-	9 +	9 +
Sistitis	7	4 -	3 +	6 + 1 -	7 +
Kristalüri + Sistitis	2	2 -	-	2 +	2 +
Kristalüri	1	1 -	-	1 +	1 +
Kalkulus + Sistitis	2	2 +	-	2 +	1 + 1 -*
Tümör	1		1 +	1 +	1 +
Nefritis	2	1 + 1 -	-	2 +	2 +
Polip	1	1 -	-	1 +	1 +

+ (Görüntülendi) ve - (Görüntülenemedi), *İzin alınmadığı için sistoskopik muayenesi yapılamadı.
+ (imaging) and - (no imaging), *Cystoscopy couldn't be done because no permission was taken.

Çalışmaya alınan hastaların 9'unda idrar kesesinde kalkulus, 7'sinde sistitis, 1'inde kristalüri, 1'inde idrar kesesi neoplazisi, 2'inde nefritis, 1'inde polip, 2'sinde kalkulus ile sistitis, 2'sinde hem kristalüri hem de sistitis tespit edildi.

Yöntemler arasındaki istatistiksel benzerlik, Cochran's Q testi ile test edildi ($P < 0.001$, Cochran's Q=16,22). Yöntemlerden elde edilen bulgular arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulundu. Buna göre radyografik yöntemin, ultrasonografik ve endoskopik yöntemlere göre tanıya daha az yardımcı olduğu sonucuna varıldı (Tablo 2).

Tablo 1. Teşhis yöntemlerinin doğruluk oranı.

Table 2. Accuracy rates of diagnostic methods.

YÖNTEMLER	Teşhis edilen olgular (+)	Teşhis edilemeyen olgular (-)
RADYOGRAFİK TANI	16 + (%64)	9 – (%36)
ULTRASONOGRAFİK TANI	24 + (%96)	1 – (%4)
ENDOSKOPİK TANI	24 + (%100)	0

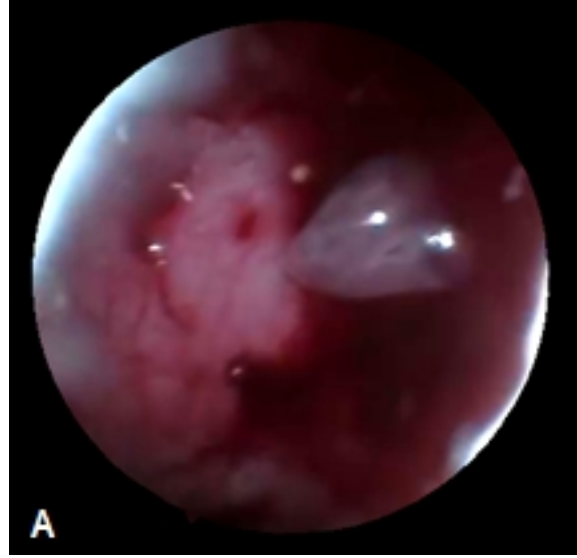
Radyografik görüntüleme de 16 olguda hastalıkların tanısı konulurken, 9 olguda konulamadı. Tanısı konulan 4 olguda indirekt radyografiden yararlanıldı.

Ultrasonografik değerlendirilmeye 24 olgu alındı. Ve bunların tümünde tanı konuldu. Sadece zor idrar yapma şikayeti olan 1 olguda değerlendirme yapılamadı.

Endoskopi yöntemi ile 24 olgunun görüntülenmesi yapıldı. Sadece 1 olgu; sahibinden izin alınamadığı için değerlendirmeye alınmadı. Değerlendirmeye alınan bütün olgularda sistoskopik muayene yöntemi ile kesin tanı konuldu.

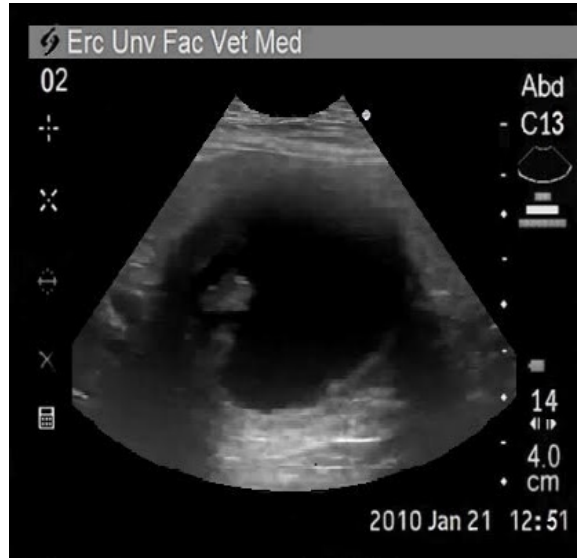
Kalkulus tanısı konulan olgularda, idrar kesesi mukozasında peteşiyel kanama alanları, kese

mukozasında enflamasyon odakları ve hiperemik üretra mukozası gözlemlendi. Teleskop ucunun temas ettiği yerlerin kanamaya eğilimli olduğu ve normalden daha fazla hiperemik olduğu görüldü (Şekil 1), (Şekil 2), (Şekil 3).



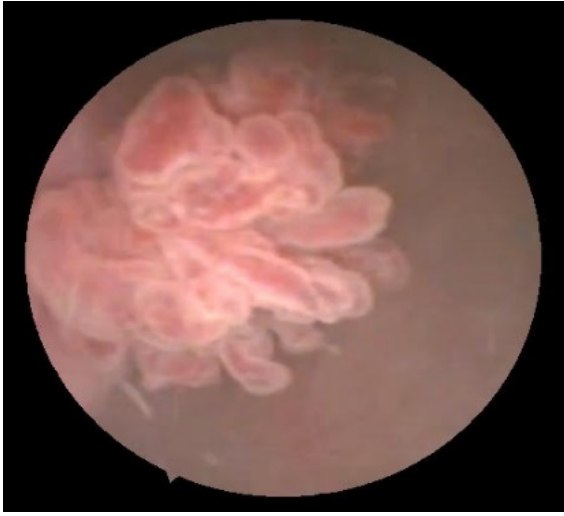
Şekil 1. İdrar kesesi kalkuluslarının L/L radyografik görünümü.

Figure 1. Radiographic view L/L of calculus in bladder.



Şekil 2: İdrar kesesi kalkulusunun ultrasonografik görünümü.

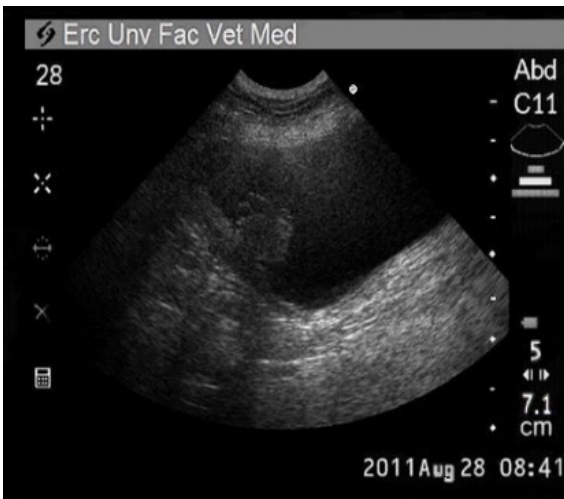
Figure 2: Ultrasonographic view of calculus in bladder.



Şekil 3. İdrar kesesi kalkulusların endoskopik görünümü.

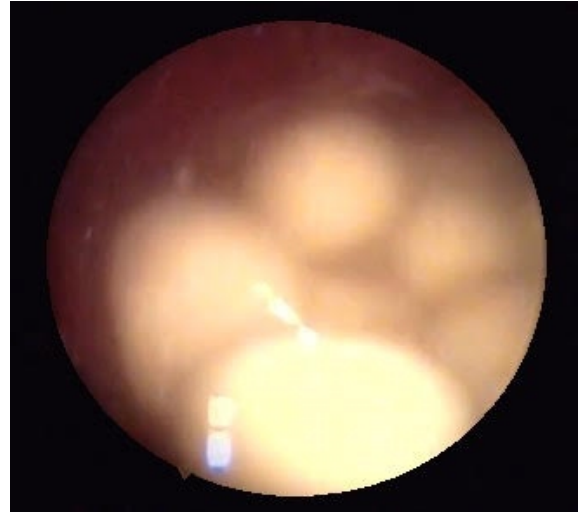
Figure 3. Endoscopic view of calculus in bladder.

Bir olgunun ultrasonografik muayenesinde; idrar kesesi duvarında değişik derecelerde diffuz veya fokal kalınlaşma, mukozada düzensizlik ve kese lümenine doğru uzanan kitleler izlendi (Şekil 4). Sistoskopik muayenesi yapılan bu olguda; geniş tabanlı karnabahar görünümlü ve kanamaları olan tümöral oluşum görüldü. Sistoskopi muayenesinde biyopsi forsepsi ile biyopsi materyali almak için tümöre ulaşıldı, ancak kanama şekilleneceği şüphesi nedeni ile işleme son verildi (Şekil 5).



Şekil 4. İdrar kesesi tümörünün ultrasonografik görünümü.

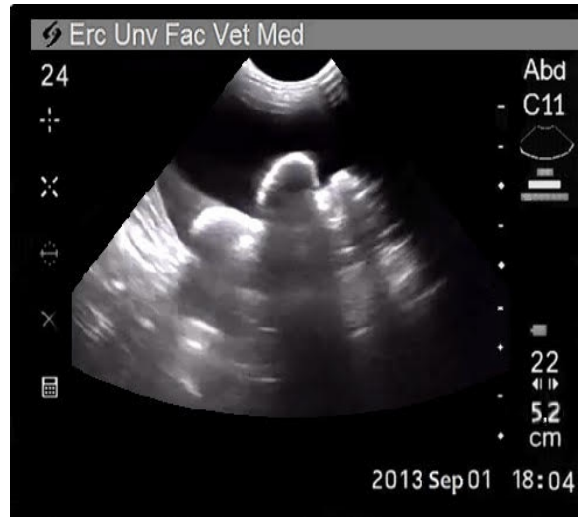
Figure 4. Ultrasonographic view of tumor in bladder



Şekil 5. İdrar kesesinde tümörün endoskopik görünümü.

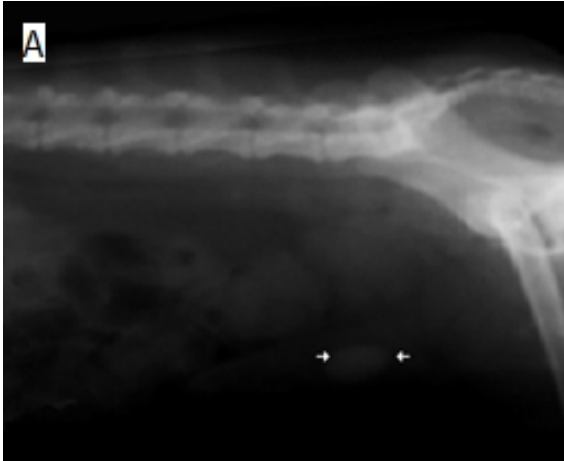
Figure 5. Endoscopic view of tumor in bladder.

Diğer bir olgunun ultrasonografik muayenesinde kese içerisinde kitle tespit edildi (Şekil 6). Olgunun yapılan sistoskopik muayenesinde idrar kesesi mukozasının düzensiz olduğu, sapla bağlı, kanamalı farklı boyutlarda mor renkli polipoid yapıya ve kan pıhtılarına rastlandı. Teleskop ucunun temas ettiği polip yapıların kanamaya eğilimli olduğu görüldü (Şekil 7).



Şekil 6: İdrar kesesinde polipin ultrasonografik görünümü.

Figure 6: Ultrasonographic view of polyp in bladder.



Şekil 7. İdrar kesesindeki polipin endoskopik görünümü.

Figure 7. Endoscopic view of polyp in bladder.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Görüntüleme tekniklerinde direkt radyografi ilk basamaktır. İdrar kesesinin görüntüsü, pozisyonu, şekli, büyüklüğü ve radyografik opasitesi hakkında bilgi edinilebilir. Keseyi görüntülemeye, en iyi görüntü sağ L/L yönlü radyografiler ile elde edilir (1,8). Hastalarımıza ilk yöntem olarak radyografi uygulaması yapıldı. Daha sonra diğer yöntemler uygulanarak hastalığın tanısı doğrulandı. Bütün olgularımızın radyografileri L/L pozisyonunda alındı ve idrar kesesinin daha net görüntülediği belirlendi.

Sistografi, idrar kesesi duvarının görüntülenmesi ya da lümen içi lezyonlarının değerlendirilmesine yardımcı olur (1,5,6). Pozitif kontrast sistografi veya çift kontrast sistografi idrar kesesi hastalıklarının belirlenmesinde en yararlı yöntemdir. Ancak, bu hastalıkların tanısında diğer tanı tekniklerinden de yararlanılmalıdır (5,7). Çalışmamızda; sistografi uyguladığımız olgularda sistitis tanısı kolaylıkla konuldu. Direk radyografi ile tanısı konulamayan olgularımıza ultrasonografi ve endoskopi uygulandı. Böylece radyografinin idrar kesesi hastalıklarında tanı için yeterli olmadığı sonucuna varıldı.

Ultrasonografi; intra-abdominal kitlesel lezyonların değerlendirilmesinde ideal bir tanı yöntemidir. Ultrasonografi uygulaması güvenlidir. Radyasyon gibi bir tehlike taşımaz. Kolay ve çabucak

uygulanabilir. Hastayı hiçbir şekilde rahatsız etmez ve ekonomiktir (8,9). Araştırmamızda; idrar kesesi intra-abdominal olarak ultrasonografi ile kolayca görüntülendi. Bu yöntemi uygulanırken olgularımızın hiçbirine herhangi bir anestezi protokolü uygulanmadı. Uygulamalar kolay ve çabuk yapıldı. Olguların ultrasonografik muayene sırasında rahat oldukları gözlemlendi.

Sistoskopi idrar kesesinin iç yüzeyinin, üretranın ve üreter açıklıklarının görüntülenmesinde, alt üriner sistem hastalıklarının tanısında, taş çıkarma ve ektopik üreter gibi hastalıklarının sağaltımında kullanılan minimal non invaziv tanı ve tedavi yöntemidir (4,14,15,17). Kliniğimize gelen olguların bütününe endoskopi uygulandı ve başarılı sonuçlar elde edildi. Sadece bir olguda hasta sahibi izin vermediği için sistoskopik muayene uygulanamadı. Bu olgunun tanısı (kalkulus sistitis); radyografik ve ultrasonografik görüntüleme yöntemleri ile konuldu. Sistoskopi ile hastalıkların tanısının kolay ve non invaziv bir şekilde yapılabileceği belirlendi. Ancak sistoskopi uygulamasında teleskop ucunun temas ettiği yerlerin kanamaya eğilimli olmasından dolayı hassas manipulasyon yapılması gerektiği görüldü.

Transüretral sistoskopi (TUC), minimal invaziv şekilde biyopsi örnekleri almak, üriner sistemin patolojik anormalliklerini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (18,19). Transüretral sistoskopi tekniğiyle patolojik yapıların belirlenmesi için biyopsi forsepsleri kullanılarak materyal alınabilmektedir. Bir olgumuzda tümör (olgu no 16), diğer olgumuz da ise polip (olgu no 25) belirlendi. Biyopsi forsepsleri ile histopatoloji için numune alınmasına karar verildi. Yapılan birkaç denemeden sonra oluşacak olan hemorajinin idrar kesesini etkileyebileceği, buna bağlı olarak da hastalığın prognozunun olumsuz etkileneceği için vazgeçildi. Biyopsi forsepsinin kullanılması için deneyime gereksinim olduğu, işlemlerin özenli ve hassas bir şekilde yapılmasının doğru olacağı, materyal alınırken de hemorajiye dikkat edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Sistoskopi işleminde bütün manipulasyonlar genel anestezi altında yapılır (16,20). Sistoskopi

uygulanan bütün olgularımıza genel anestezi protokolü uygulandı. Sadece premedikan bir preparat uygulanarak sağlanan sedasyon ile sistoskopi işlemleri yapılamadı. Genel anestezinin özellikle üretral kaslarda meydana getirdiği gevşeme, rijit endoskopun üretraya girişinin kolay ve rahat olmasını sağladı.

Sistoskopide üretraya girmedeki zorluk en önemli problemlerden biridir. Sistoskopun çapı hastanın üretra geçişinde önemli bir kriterdir. Üretral geçişte kullanılacak kanülün büyük olması mikroskobik veya makroskobik hematüriye neden olmaktadır. Hastaların büyüklüğüne göre farklı boyutlarda kanül kullanılması ile sorun çözülmektedir. Endoskopi uygulamalarında bölgesel mukozaya, üretraya ve/veya idrar kesesine hasar verilebilmektedir. Ayrıca, kullanılan ekipmanların sterilizasyonundaki aksaklıklar da idrar yollarında enfeksiyona neden olabilmektedir (3,4). Endoskopi uygulamalarımızda üretraya girişte zorlanıldı. Bazı olgularda üretrada küçük kanamalar oluştu. Muayeneden sonra kullanılan ekipmanın dezenfeksiyonu çok dikkatli ve özenli bir şekilde yapıldığında uygulama sonrası hastalarımızda herhangi bir enfeksiyon ya da komplikasyon ile karşılaşmadı.

Radyoloji ile yapılan muayenelerde amfiatöz sistitis gözden kaçabilmektedir. Ancak, ultrasonografik muayene ile bu bozukluklar erken dönemde belirlenebilmektedir (21). Dört sistitis, 2 kristalüri ile birlikte seyreden sistitis, 1 kristalüri, tümör ve polip olgularında radyografik görüntüleme ile tanıların yapılamadığı, ultrasonografik yöntemin uygulanması ile yapılabildiği görüldü. Endoskopi ile bu tanıların doğrulandığı, ultrasonografik görüntüleme yönteminin erken tanı da uygulanabilir olduğu belirlendi.

Üreterler, renal pelvis ve alt üriner sistem hastalıklarının ultrason ile daha sonra da indirekt radyografilerinin alınması ile tanısı kolaylıkla konulur. Tek başına kullanıldıklarında her iki teknik te kesin tanı için yeterli değildir (22). Çalışmamızda radyografi yönteminin tek başına tanı için yeterli olmadığı, kesin

tanının ultrasonografik yöntem ile birlikte konulabileceği, ultrasonografinin ise tek başına yeterli olabildiği sonucuna varıldı.

İdrar kesesi poliplerinin belirlenmesinde ultrasonografi tekniği noninvaziv ve çok yararlı bir tanı aracıdır (23). Radyografik yöntem ile tanı konulamayan bir olgumuzda (olgu No 26), ultrasonografi ve endoskopi ile polip tanısı konuldu. Ultrasonografi ile polip tanınması yapılabileceği ancak, endoskop ile kesin tanı konulabileceği belirlendi.

İdrar kesesi muayenesi için sistoskopi mükemmel bir görüntüleme tekniğidir. İdrar kesesindeki bir kitlenin kesin tanısı için sistoskopi yolu ile biyopsi yapılması gerekir (24). Sistoskopi uygulamalarımızda iki olguda biyopsi yapılmasına karar verildi. Ancak uygulamadaki deneyim eksikliği ve oluşabilecek hemorajinin problem yaratabileceği düşüncesi ile bu uygulamadan vazgeçildi. Sistoskopi uyguladığımız 24 olgunun hepsinde kesin tanının konulması, sistoskopinin mükemmel bir görüntüleme tekniği olduğunu gösterdi.

Köpeklerde idrar kesesi taşlarının tanısında radyografik ve ultrasonografik bulgular birbirini tamamlar (8). Ürolitiazisin tanısında direkt, pozitif kontrast radyografi ve ultrasonografi birlikte değerlendirilir (25). Araştırmamızda kalkulus şüphesi bulunan olguların kesin tanısı hem radyografik hem de ultrasonografik yöntem birlikte kullanılarak konuldu. İdrar kesesi taşlarının tanısında bu iki yöntemin birbirini tamamladığı ve birlikte kullanılması gerektiği belirlendi.

Endoskopi uygulamasında en sık görülen komplikasyonlar; üretra veya idrar kesesinin delinmesi ile idrar yolu enfeksiyonlarının şekillenmesidir (16). Endoskopi uyguladığımız 24 olguda hiçbir komplikasyon ile karşılaşmadı. Ancak idrar kesesi ve üretraya girişte özen gösterilmez ise delinebileceği, kanamaların olabileceği, asepsi ve antisepsi kurallarına uyularak çalışılmaz ise enfeksiyon oluşabileceği görüşüne varıldı.

Sonuç olarak; elde edilen bulgulara dayanılarak dişi köpeklerde idrar kesesi hastalıklarının kesin tanısı için, endoskopik ve ultrasonografik yöntemin radyografik yöntemle göre daha avantajlı olduğu belirlendi. Endoskopik yöntemin uretra, idrar kesesi içi ve bu dokularda karşılaşılan lezyonların rengini, vaskülarizasyonunu ve kanamaya eğilimli olmalarını belirlemek ve tanımlamak açısından, ultrasonografik yöntemle göre daha üstün olduğu saptandı. İdrar kesesi ve üretra lezyonlarını tanımlamak için radyografik yöntemin tek başına yeterli olmadığı, ancak kesin tanı konulmasında destekleyici bir yöntem olarak kullanılabileceği düşünüldü. Ultrasonografik yöntemin kesin tanı için yeterli olabileceği, ancak diğer metotlarla desteklenmesi gerektiği, spesifik olgularda kolayca uygulanabileceği görüldü. Endoskopik görüntülemenin ise dişi köpeklerde idrar kesesi hastalıklarının tanısında tek başına kullanılabileceği ve kolaylıkla uygulanabilen noninvaziv bir yöntem olduğu sonucuna ulaşıldı.

KAYNAKLAR

- Arıcan M., 2012. Veteriner Genel Radyoloji ve Kedi Köpek İçin Tanısal Radyografi Atlası Cilt II, 481-484, Bahçivanlar Basım Sanayi A.Ş., Konya.
- Sutherland SJ., Penninck D., 2015. Bladder and Uretra. In "Atlas of Small Animal Ultrasonography", Eds., D Penninck, M-A d'Anjou, 2nd ed., 363-386 John Wiley - Sons, Inc. Oxford.
- McCarthy TC., 2005. Cystoscopy. In "Veterinary Endoscopy For The Small Animal Practitioner", Ed., McCarthy TC., 49-135, Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Rawlings CA., Berent AC., 2011. Cystoscopy, In "Small Animal Endoscopy", Eds., TR Tams, CA Rawlings, 3 th ed., 507-554, Mosby, St. Louis, Missouri.
- Essman SC., 2005. Contrast cystography. Clin Tech Small Anim Pract, 20, 46-51.
- Kealy JK., McAllister H., 2011. Diagnostic Radiology and Ultrasonography of the Dog and Cat. 4th ed., 126-144, Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Thrall DE., 2018. Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology. 7th Ed., 847-863, Elsevier, St. Louis, Missouri.
- Bumin A., Temizsoylu D., 2000. Köpeklerde idrar kesesi taşlarının radyografik ve ultrasonografik tanısı ve şirurjikal sağaltımı. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 47, 213-221.
- Şındak N., Biricik HS., 2006. Köpeklerde karın içi organ hastalıklarının ultrasonograf ile değerlendirilmesi. YYÜ Vet Fak Derg, 17, 75-79.
- Atalan G., 2013. İdrar kesesi ve üretra. "Küçük Hayvan Ultrasonografi Atlası", Ed., DS İntaş, 365-382, Medipres, Malatya.
- King AM., 2006. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. Vet J, 171, 408-420.
- Jones K., Case JB., Evans B., Monnet E., 2017. Evaluation of the economic and clinical feasibility of introducing rigid endoscopy and laparoscopy to a small animal general practice. J Am Vet Med Assoc, 250, 795-800.
- Libermann SV., Doran IC., Bille CR., Bomassi EG., Rattez EP., 2011. Extraction of urethral calculi by transabdominal cystoscopy and urethroscopy in nine dogs. J Small Anim Pract, 52, 190-194.
- Houston DM., Weese HE., Vanstone NP., Moore AE., Weese JS., 2017. Analysis of canine urolith submissions to the Canadian Veterinary Urolith Centre, 1998-2014. Can Vet J, 58, 45-50.
- Heilmann RM., 2016. Minimally invasive interventional techniques involving the urogenital tract in dogs and cats. Tierärztliche Praxis Kleintiere, 44, 105-115.
- Grzegory M., Kubiak K., Jankowski M., Spuzak J., Głinska-Suchocka K., Nicpon J., Halon A., 2013. Endoscopic examination of the urethra and the urinary bladder in dogs-indications, contraindications and performance technique. Pol J Vet Sci, 16, 797-801.
- Chandrapuria VP., Gupta D., Shahi A., Kumar D., Rai S., 2014. Urethroscopic diagnosis and therapeutic management of urinary tract disorder in female dogs. Indian J Surg, 6, 72-79.
- Childress MO., Adams LG., Ramos-Vara JA.,

- Freeman LJ., He S., Constable PD., Knapp DW., 2011. Results of biopsy via transurethral cystoscopy and cystotomy for diagnosis of transitional cell carcinoma of the urinary bladder and urethra in dogs: 92 cases (2003-2008). *J Am Vet Med Assoc*, 239, 350-356.
19. Sycamore KF., Poorbaugh VR., Pullin SS., Ward RC., 2014. Comparison of urine and bladder or urethral mucosal biopsy culture obtained by transurethral cystoscopy in dogs with chronic lower urinary tract disease: 41 cases (2002 to 2011). *J Small Anim Pract*, 55, 364-368.
20. Morgan M., Forman M., 2015. Cystoscopy in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 45, 665-701.
21. Petite A., Busoni V., Heinen M-P., Billen F., Snaps F., 2006. Radiographic and ultrasonographic findings of emphysematous cystitis in four nondiabetic female dogs. *Vet Radiol Ultrasound*, 47, 90-93.
22. Heuter KJ., 2005. Excretory Urography. *Clin Tech Small Anim Pract*, 20, 39-45.
23. Takiguchi M., Inaba M., 2005. Diagnostic ultrasound of polypoid cystitis in dogs. *J Vet Med Sci*, 67, 57-61.
24. Fulkerson CM., Knapp DW., 2015. Management of transitional cell carcinoma of the urinary bladder in dogs: a review. *Vet J*, 205, 217-225.
25. Sancak İG.,  zgencil FE., Sancak AA., 2009. Fakülte kliniklerine gelen (2002-2003) kedi ve köpeklerde urolitiazis olgularının klinik değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 105-111.



Achillea millefolium (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in *In Vitro* Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri*

Emin ŞENGÜL¹✉, Fikret ÇELEBİ¹, Ali ÇINAR¹

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

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
29.01.2018	04.04.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Şengül E, Çelebi F, Çınar A: *Achillea millefolium* (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in *In Vitro* Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 326-336, 2018.
DOI:10.17094/ataunivbd.385704

Öz: Civanperçemi (CP) alternatif tıpta yaygın olarak kullanılmakta ve yapısında birçok bileşikle birlikte Luteolin de bulunmaktadır. Bu çalışmada, CP metanol ekstraktı ve Luteolin'in izole rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri araştırıldı. Çalışmada 20 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı ve ratlar anestezi altında dekapite edildiler. İzole edilen mesanelerin temizlikleri yapıldı ve mesanelerden hazırlanan kas şeritleri organ banyosuna asıldı. Dokuya 1 gram gerim uygulandı ve 1 saatlik inkübasyon periyoduna bırakıldı. Inkübasyon periyodu sonunda banyoya CP ekstraktı, Luteolin, asetilkolin (ACh), potasyum klorür (KCl) ve Nifedipin bir protokol çerçevesinde uygulandı. Veriler one way ANOVA'da Tukey testi ile değerlendirildi. CP ekstraktı ve Luteolin'in farklı dozlarının, ACh ve KCl ile indüklenen izole mesane kontraksiyonlarını inhibe ettikleri belirlendi. ACh'nin submaksimal dozu ile indüklenen kontraksiyonların banyoda Nifedipin varlığında CP ekstraktı ve Luteolin ile daha güçlü bir şekilde baskılandığı görüldü. KCl'nin submaksimal dozu ile indüklenen kontraksiyonları CP ekstraktı ile Nifedipin'in birlikte daha fazla inhibe ettikleri belirlendi, ancak banyoda Nifedipin varlığında Luteolin'in etkisinin değişmediği tespit edildi. Bu çalışmada CP ekstraktı ve Luteolin'in farklı dozlarının mesane düz kas kontraksiyonlarını inhibe ettikleri ve CP ekstraktı ve Luteolin'in L tipi Ca²⁺ kanalları aracılığıyla etkili olurken, CP ekstraktının ayrıca M₃ reseptör yolu üzerinden de etkili olabileceği belirlendi.

Anhtar Kelimeler: Civanperçemi, Luteolin, Mesane, Rat.

The Effects of *Achillea millefolium* (Yarrow) Extract and Luteolin on *In Vitro* Rat Urinary Bladder Muscles

Abstract: Yarrow (CP) is commonly used in alternative medicine and in its structure is found Luteolin together with many compounds. In this study, effects of CP methanol extract and Luteolin on isolated rat bladder smooth muscle contractility were investigated. In the study, twenty male Sprague Dawley rats were used and the rats were decapitated under anesthesia. The cleaning of isolated bladders were done and muscle strips prepared from the bladders were placed to organ baths. The tissues were applied to 1 gram tension and left for 1 hour incubation period. At the end of the incubation period, CP extract, Luteolin, acetylcholine (ACh), potassium chloride (KCl) and Nifedipine was applied with a protocol the bath. Data were evaluated by Tukey test in one way ANOVA. It was determined that different doses of CP extract and Luteolin inhibited the isolated bladder contractility induced by ACh and KCl. It was seen that of the contractions induced by ACh submaximal dose more strongly suppressed by CP extract and Luteolin in the presence of Nifedipine in the bath. Subcutaneous dose-induced indications of KCl were found to be more inhibitory in co-existence of CP extract and Nifedipine. It was determined that together with CP extract and Nifedipine were more inhibited the KCl's submaximal dose-induced contractions, but but the effect of Luteolin in the presence of Nifedipine in bath was not changed. In this study, it was assigned that inhibiting the bladder smooth muscle contractions of different doses of CP extract and Luteolin and of CP extract to be also effective on the M₃ receptor pathway.

Keywords: Luteolin, Rat, Urinary bladder, Yarrow.

✉ Emin ŞENGÜL

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: emin.sengul@atauni.edu.tr

*Bu makale "*Achillea millefolium* (Civanperçemi) Ekstraktlarının ve Bazı Biyolojik Aktif Bileşiklerinin *In Vitro* Ortamda Rat Mesanesi Düz Kasları Üzerine Etkilerinin Araştırılması" isimli doktora tezinden hazırlanmıştır.

GİRİŞ

Achillea millefolium (civanperçemi) dünyanın çeşitli bölgelerinde yetişen, çok yıllık bir bitki türüdür (1-4). Alternatif tıpta sıklıkla kullanılan Civanperçemi (CP)'nin (5) yapısında 100'den fazla biyolojik aktif bileşik bulunmaktadır (6). CP'nin yapısındaki bileşiklerin güçlü antioksidan aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir (7). CP aynı zamanda antimikrobiyal, iltihabı azaltıcı, karaciğer koruyucu ve kalsiyum (Ca²⁺) antagonist aktivitelere sahiptir (8,9). CP metanol ekstraktının hipotansif ve vazodilatatör etkiye sahip olduğu (10) ve bu etkinin yapısında bulunan artemetin bileşiğinin Anjiyotensin Konverting Enzim'i inhibe etmesiyle gerçekleştiği belirlenmiştir (11). CP sulu ekstraktının farelerde *in vitro* mide düz kas kontraksiyonlarını indüklediği (12) ve CP'nin yapısındaki flavonoidlerin izole ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttıkları rapor edilmiştir (13-15). *In vitro* kobay ileumunda yapılan bir başka çalışmada ise, CP'nin hidroalkolik ekstraktının doza bağımlı olarak elektriksel alan stimülasyonu (EFS) ile indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiği tespit edilmiştir (16). CP'nin yapısında bulunan flavonoid bileşikler, izole kobay ileumunda Ca²⁺'nin hücre içine akımını bloke ederek spazmolitik etki oluşturmaktadırlar (15). CP'nin yapısında bulunan biyolojik aktif bileşiklerden birisi de Luteolin'dir (17). Luteolin antiinflamatuvar ve antikanser etkilere sahip bir flavonoidtir (18,19). Luteolin reaktif oksijen ve nitrojen moleküllerini ortadan kaldırarak antioksidan etki oluşturmaktadır (20). Bu etkilerinin yanı sıra, damarlarda güçlü bir vazodilatatör olan nitrik oksit (NO) sentezinden sorumlu olan endotelial NO sentetaz (eNOS) düzeyini artırarak damarlarda gevşemeye neden olmaktadır (21). Ayrıca Luteolin'in kobay ileumu kontraksiyonlarını inhibe ederek, spazmolitik etki oluşturduğu belirlenmiştir (15). CP ekstraktları ve Luteolin'in çeşitli düz kasların myojenik aktivite üzerine etkileri birçok farklı çalışma ile belirlenmiş olmasına rağmen, mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri ile alakalı yeterli literatür bilgi

bulunmamaktadır. Bu çalışmada, CP metanol ekstraktı ve Luteolin'in *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmamız, Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2012/655 nolu kararı ile onaylandı ve Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü BAP birimi tarafından 2012/362 No'lu proje kapsamında desteklendi. Çalışmada, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilen, ortalama 200-250 gr ağırlığında ergin 20 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. 10 adet rat *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonlarının asetilkolin (ACh) ile indüklediği çalışmalarda, kalan 10 rat ise potasyum klorür (KCl) ile indüklediği çalışmalarda kullanıldı. Tüm hayvanlar standart bakım ve besleme şartlarına tabi tutuldu ve herhangi bir kısıtlama yapılmadı.

Mesane Düz Kas Şeritlerinin Hazırlanması

Ketamin (75mg/kg)-Rompun (15mg/kg) eşliğinde anesteziye alınan hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi edildiler. Mesane dokusu hızlı bir şekilde izole edilerek içerisinde +4°C sıcaklığında Krebs solüsyonu (mM: NaCl 119, KCl 4.75, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, MgSO₄ 1.5, CaCl₂ 2.5, glukoz 11) bulunan petri kutusunda temizliği yapıldı. Mesaneden vertikal yönde, 2x10 mm ebadında iki veya üç kas şeridi hazırlandı. Hazırlanan kas şeritleri pH'sı 7.4 ve sıcaklığı 37°C olan Krebs solüsyonu ile dolu 20 ml'lik organ banyosuna yerleştirilerek alt ucu banyo tabanındaki çelik çengele üst ucu ise bir çelik tel ile transdusere (ELJ-S045C-EMKA-R04003 ve R04004) bağlandı ve banyo %95 O₂ ve %5 CO₂ ile sürekli gazlandırıldı. Doku şeritlerine 1 gr gerim uygulandı ve 1 saatlik inkübasyon periyoduna tabi tutuldu. İnkübasyon periyodu esnasında banyo ortamı 15 dakikalık periyotlarla Krebs solüsyonu ile yıkandı (22,23). İnkübasyon periyodu sonunda ACh'nin dozları (10⁻⁹-10⁻³ M) banyoya kümülatif

uygulanarak doz cevap eğrisi elde edildi. Dokular üç kez yıkanıp 5 dk dinlendirildi ve bu işlem üç kez tekrarlandı. Daha sonra CP ekstraktı veya Luteolin'in en düşük dozları ayrı ayrı banyoya uygulandı ve 10 dk maruziyet süresi sonunda ACh dozları (10^{-9} - 10^{-3} M) banyoya kümülatif uygulanarak doz cevap eğrisi elde edildi ve dokular üç kez yıkanarak 5 dk dinlendirildi. Bu işlemler CP ekstraktı ve Luteolin'in her bir dozu için ayrıca yapıldı. Banyoda CP ekstraktı ve Luteolin'in dozlarının varlığında ve yokluğunda ACh'nin 10^{-9} - 10^{-3} M dozları ile elde edilen doz cevap eğrileri karşılaştırılarak değerlendirildi. Bu protokol kontraksiyonları indükleyici ajan olarak KCl'nin kümülatif dozları (20, 40, 60, 80 ve 100 mM) banyoya uygulanarak da yapıldı. CP ekstraktı ve Luteolin'in mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkilerinin mekanizmasının araştırılması amacıyla L tipi Ca^{2+} kanal blokörü olan Nifedipin kullanıldı. Banyoda Nifedipin (10^{-7} M) varlığında ve yokluğunda ACh ve KCl'nin submaksimal dozları ile indüklenen kontraksiyon cevapları üzerine CP ekstraktı veya Luteolin'in en yüksek dozlarının etkileri belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS20 istatistik programı kullanılarak yapıldı. Sonuçların değerlendirilmesinde One Way ANOVA'da Duncan testi uygulandı. Değerler, ortalama±Standard sapma (SD) olarak verildi. $P<0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

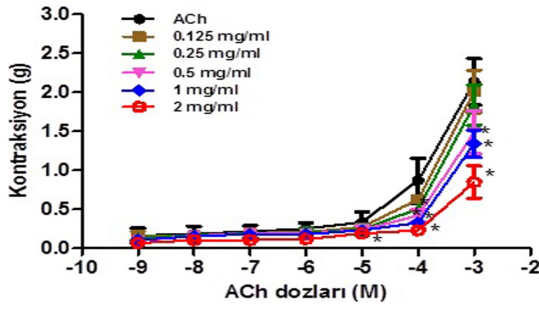
BULGULAR

CP ekstraktının 0.125 mg/mL dozunun ACh'nin 10^{-9} - 10^{-3} M dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyonlar üzerine önemli bir etkisinin olmadığı belirlendi (Tablo 1, Şekil 1, $P>0.05$, $n=10$). CP ekstraktının 0.25 mg/mL dozunun ACh'nin 10^{-4} M dozu ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını (Tablo 1, Şekil 1, $P<0.05$, $n=10$), 0.5 ve 1 mg/mL dozunun ACh'nin 10^{-4} ve 10^{-3} M dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını (Tablo 1, Şekil 1, $P<0.001$, $n=10$) ve 2 mg/mL dozunun ise ACh'nin 10^{-6} , 10^{-4} ve 10^{-3} M dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını önemli ölçüde azalttığı belirlendi (Tablo 1, Şekil 1, $P<0.001$, $n=10$).

Tablo 1. CP ekstraktı'nın farklı dozlarının ACh ile indüklenmiş *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkisi ($n=10$).

Table 1. The effects of different doses of CP extract on ACh-induced *in vitro* bladder smooth muscle contractility ($n=10$).

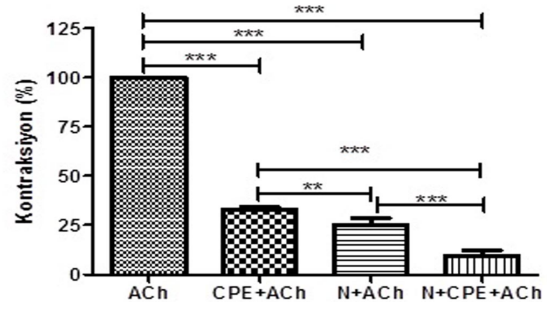
ACh Dozları	CP EKSTRAKTI					
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	0.125 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	0.25 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	0.5 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	1 mg/ml $\bar{X} \pm SD$	2 mg/ml $\bar{X} \pm SD$
10^{-9} M	0.16±0.09 ^a	0.15±0.06 ^a	0.14±0.04 ^a	0.1±0.03 ^a	0.11±0.04 ^a	0.07±0.04 ^a
10^{-8} M	0.19±0.09 ^a	0.16±0.05 ^a	0.17±0.04 ^a	0.16±0.03 ^a	0.15±0.02 ^a	0.11±0.04 ^a
10^{-7} M	0.21±0.07 ^a	0.2±0.04 ^a	0.19±0.03 ^a	0.19±0.04 ^a	0.18±0.04 ^a	0.10±0.04 ^a
10^{-6} M	0.25±0.07 ^a	0.2±0.05 ^{ab}	0.2±0.6 ^{ab}	0.19±0.04 ^{ab}	0.18±0.03 ^{ab}	0.12±0.04 ^b
10^{-5} M	0.33±0.13 ^a	0.27±0.07 ^a	0.24±0.07 ^a	0.23±0.05 ^a	0.23±0.05 ^b	0.19±0.05 ^a
10^{-4} M	0.87±0.28 ^a	0.63±0.04 ^a	0.51±0.04 ^b	0.42±0.07 ^{bc}	0.33±0.04 ^c	0.23±0.05 ^d
10^{-3} M	2.13±0.29 ^a	2.01±0.27 ^{ab}	1.84±0.25 ^{ab}	1.49±0.28 ^{bc}	1.34±0.17 ^c	0.85±0.2 ^d



Şekil 1. Banyoda CP ekstraktının farklı dozlarının varlığında ve yokluğunda ACh (10^{-9} - 10^{-3} M) ile indüklenen *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi doz cevap eğrileri (n=10, P<0.05).

Figure 1. The *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility dose-response curves induced by ACh (10^{-9} - 10^{-3} M) in the presence and absence of different doses of CP extract in bath (n=10, P<0.05).

10^{-4} M ACh ile indüklenen izole detrusor kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının en yüksek dozu olan 2 mg/ml dozunun etkileri banyoda L tipi Ca^{2+} kanal blokörü olan Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında ACh ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı (Şekil 2) ve banyoya CP ekstraktı ve Nifedipin birlikte uygulandığında ACh ile indüklenen kontraksiyon cevaplarının daha fazla azaldığı tespit edildi (Şekil 2, n=10, P<0.001***, P<0.05**).



Şekil 2. 10^{-7} M Nifedipin varlığında ve yokluğunda 10^{-4} M ACh ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının (2 mg/ml) etkisi (n=10, P<0.0001***, P<0.01**; ACh: Asetilkolin; CPE: Civanperçemi ekstraktı; N: Nifedipin).

Figure 2. The effect of CP extract (2 mg/ml) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 10^{-4} M ACh in the presence and absence of 10^{-7} M Nifedipine (n=10, P<0.0001***, P<0.01**; ACh: Acetylcholine; CPE: Yarrow extract; N: Nifedipine).

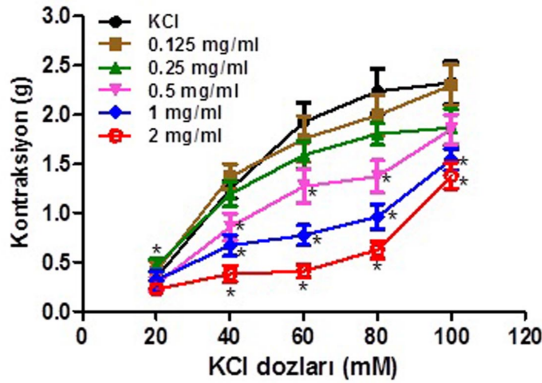
CP ekstraktının 0.125 mg/mL dozunun, KCl dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyonlar üzerine anlamlı bir etki oluşturmadığı gözlemlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P>0.05). CP ekstraktının 0.25 mg/mL dozunun KCl'nin 20 mM dozunun cevabını önemli ölçüde artırdığı belirlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05). 0.5 mg/mL dozunun KCl'nin 40, 60 ve 80 mM dozları ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını anlamlı düzeyde azalttığı (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05), 1 ve 2 mg/mL dozlarının ise KCl'nin 20 mM dozu hariç diğer tüm dozlarının kontraksiyon cevaplarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlendi (Tablo 2, Şekil 3, n=10, P<0.05).

Tablo 2. CP ekstraktının farklı dozlarının KCl ile indüklenmiş *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine etkileri (n=10).

Table 2. The effects of different doses of CP extract on KCl-induced *in vitro* bladder smooth muscle contractility (n=10).

KCl	CP EKSTRAKTI					
	Kontrol	0,125 mg/ml	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20 mM	0.34±0.01 ^a	0.41±0.10 ^{ab}	0.47±0.06 ^b	0.27±0.10 ^a	0.33±0.12 ^a	0.22±0.12 ^a
40 mM	1.24±0.19 ^a	1.37±0.20 ^a	1.19±0.22 ^{ab}	0.85±0.17 ^b	0.67±0.13 ^b	0.38±0.11 ^c
60 mM	1.92±0.30 ^a	1.75±0.40 ^{ab}	1.58±0.23 ^{ab}	1.27±0.25 ^b	0.77±0.18 ^c	0.4±0.08 ^d
80 mM	2.24±0.41 ^a	1.99±0.51 ^{ab}	1.8±0.37 ^{ab}	1.37±0.35 ^{bc}	0.96±0.18 ^c	0.62±0.11 ^d
100mM	2.32±0.33 ^a	2.3±0.41 ^a	1.86±0.31 ^{ab}	1.85±0.28 ^{ab}	1.56±0.31 ^b	1.38±0.22 ^b

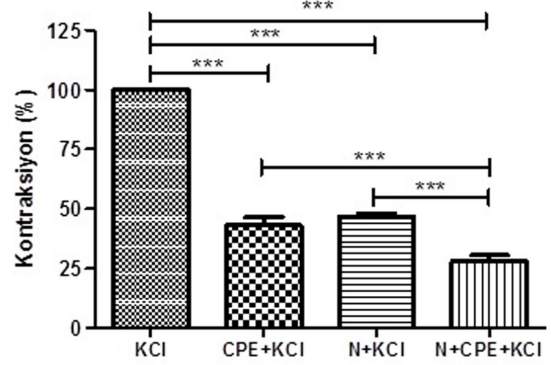
Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. a, b ve a, bc: P<0.05; a, c: P<0.01.



Şekil 3. KCl'nin kümülatif dozları (20-100 mM) ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine CP ekstraktının farklı dozlarının etkisi (n=10, P<0.05).

Figure 3. Effect of different doses of CP extract on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses (20-100 mM) of KCl (n=10, P<0.05).

60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine CP ekstraktının en yüksek dozu olan 2 mg/ml dozunun etkileri banyoda L tipi Ca^{2+} kanal blokörü olan Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında KCl (60 mM) ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı, CP ekstraktı ve Nifedipin'in birlikte uygulanmasının sadece Nifedipin'e kıyasla KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını daha güçlü bir şekilde baskıladığı tespit edildi (Şekil 4, n=10, ***: P<0.001).



Şekil 4. 10^{-7} M Nifedipine'nin varlığında ve yokluğunda 60 mM KCl ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının (2 mg/ml) etkisi (n=10, P<0.001***; KCl: Potasyum klorür; CPE: Civanperçemi ekstraktı; N: Nifedipin).

Figure 4. The effect of CP extract (2 mg/ml) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 60 mM KCl in the presence and absence of 10^{-7} M Nifedipine (n=10, P<0.001***; KCl: Potassium chloride; CPE: Yarrow extract; N: Nifedipine).

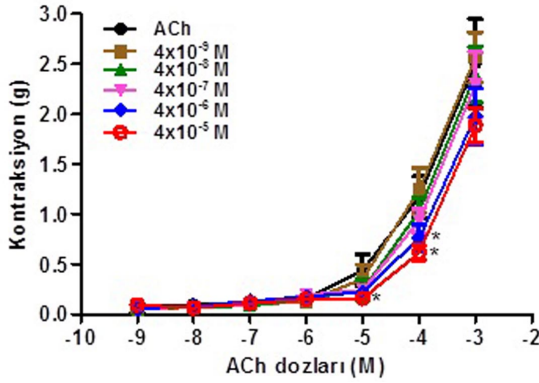
Luteolin'nin 4×10^{-9} , 4×10^{-8} ve 4×10^{-7} M dozlarının, ACh'nin 10^{-9} - 10^{-3} M dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevaplarını kontrole kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değiştirmediği belirlendi (Tablo 3, Şekil 5, n=10, P>0.05). Luteolin'nin 4×10^{-6} M dozu 10^{-4} M ACh ile indüklenen kontraksiyonları ve Luteolin'in 4×10^{-5} M dozu ise 10^{-5} ve 10^{-4} M ACh ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını önemli ölçüde azalttı (Tablo 3, Şekil 5, P<0.05, n=10).

Tablo 3. ACh'nin kümülatif dozları ile indüklenmiş *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10).

Table 3. The effects of different doses of Luteolin on *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses of ACh (n=10).

ACh (log)	LUTEOLİN					
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	4×10^{-9} M $\bar{X} \pm SD$	4×10^{-8} M $\bar{X} \pm SD$	4×10^{-7} M $\bar{X} \pm SD$	4×10^{-6} M $\bar{X} \pm SD$	4×10^{-5} M $\bar{X} \pm SD$
10^{-9} M	0.07±0.05 ^a	0.05±0.01 ^a	0.05±0.01 ^a	0.05±0.02 ^a	0.05±0.02 ^a	0.09±0.01 ^a
10^{-8} M	0.09±0.05 ^a	0.07±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.07±0.02 ^a	0.08±0.02 ^a	0.06±0.02 ^a
10^{-7} M	0.10±0.05 ^a	0.09±0.03 ^a	0.08±0.02	0.1±0.03 ^a	0.13±0.04 ^a	0.11±0.02 ^a
10^{-6} M	0.15±0.04 ^{ab}	0.13±0.02 ^a	0.15±0.02 ^a	0.19±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a	0.15±0.03 ^a
10^{-5} M	0.42±0.15 ^a	0.35±0.14 ^a	0.24±0.10 ^{ab}	0.24±0.08 ^{ab}	0.23±0.07 ^{ab}	0.15±0.03 ^b
10^{-4} M	1.16±0.2 ^a	1.24±0.32 ^{ab}	1.02±0.16 ^{ab}	0.93±0.12 ^{ab}	0.76±0.17 ^{bc}	0.61±0.07 ^c
10^{-3} M	2.51±0.78 ^a	2.56±0.57 ^a	2.37±0.58 ^a	2.28±0.64 ^a	1.96±0.44 ^a	1.94±0.19 ^a

Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır. ^{a, b, c}: P<0.05; ^{a, c}: P<0.01.

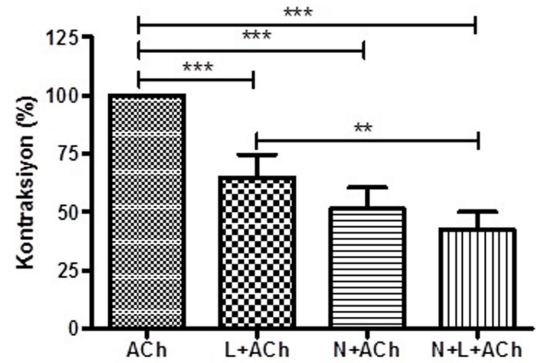


Şekil 5. ACh'nin 10^{-9} - 10^{-3} M dozları ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10, P<0.05).

Figure 5. Effects of different doses of Luteolin on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by 10^{-9} - 10^{-3} M doses of ACh (n=10, P<0.05).

10^{-4} M ACh ile indüklenen izole detrusor kontraksiyonları üzerine Luteolin'in 4×10^{-5} M dozunun etkileri banyoda Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem CP ekstraktı hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında ACh ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 6, n=10, P<0.001). Banyoda Luteolin varlığında elde edilen kontraksiyon cevapları ile Luteolin ve Nifedipin'in birlikte varlığında alınan kontraksiyon cevapları arasında istatistiksel olarak

anlamlı farklılık olduğu tespit edildi (Şekil 6, n=10, P<0.001***, P<0.01**).



Şekil 6. 10^{-7} M Nifedipine'nin varlığında ve yokluğunda 10^{-4} M ACh ile indüklenen *in vitro* rat mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in (4×10^{-5} M) etkisi (n=10, p<0.001***, P<0.01**; ACh: Asetilkolin; L: Luteolin; N: Nifedipin).

Figure 6. The effect of Luteolin (4×10^{-5} M) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 10^{-4} M ACh in the presence and absence of 10^{-7} M Nifedipine (n=10, P<0.001***, P<0.01**; ACh: Acetylcholine; L: Luteolin; N: Nifedipine).

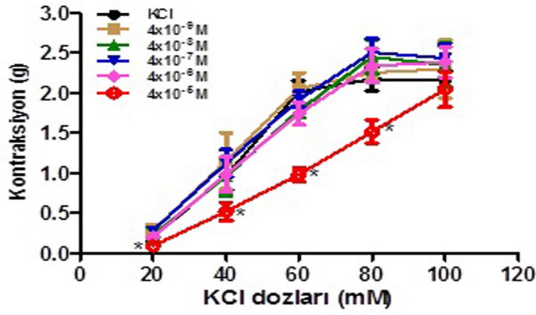
KCl dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevapları üzerine Luteolin'in 4×10^{-9} - 4×10^{-6} M dozlarının, anlamlı bir etkilerinin olmadığı belirlendi (Tablo 4, Şekil 7, n=10, P>0.05). Luteolin'in 4×10^{-5} M dozu ise, KCl'nin 20, 40, 60 ve 80 mM dozları ile indüklenen kontraksiyonları önemli ölçüde azalttı (Tablo 4, Şekil 7, n=10, P<0.05).

Tablo 4. KCl'nin kümülatif dozları ile indüklenmiş *in vitro* rat mesane düz kas kontraktilitesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10).

Table 4. The effects of different doses of Luteolin on *in vitro* rat bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses of KCl (n=10).

KCl	LUTEOLİN					
	Kontrol	4×10^{-9} M	4×10^{-8} M	4×10^{-7} M	4×10^{-6} M	4×10^{-5} M
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
20 mM	0.20±0.08 ^{ab}	0.27±0.1 ^a	0.22±0.09 ^{ab}	0.28±0.07 ^a	0.2±0.05 ^a	0.09±0.05 ^b
40 mM	0.96±0.31 ^a	1.15±0.42 ^a	0.95±0.23 ^a	1.12±0.25 ^a	0.98±0.29 ^a	0.52±0.11 ^b
60 mM	2.02±0.42 ^a	2.04±0.33 ^a	1.78±0.24 ^a	1.91±0.28 ^a	1.73±0.33 ^a	0.98±0.11 ^b
80 mM	2.17±0.63 ^{ab}	2.25±0.43 ^a	2.44±0.45 ^a	2.58±0.51 ^a	2.33±0.41 ^a	1.51±0.18 ^b
100 mM	2.15±0.59 ^a	2.21±0.48 ^a	2.35±0.35 ^a	2.43±0.42 ^a	2.38±0.34 ^a	2.04±0.28 ^a

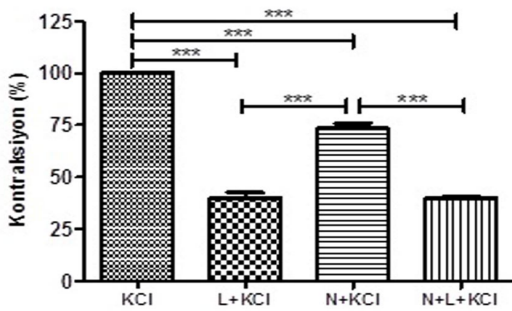
Aynı satırda farklı harflerle ifade edilen değerler arasındaki fark anlamlıdır, ^{a,b}: P<0.05.



Şekil 7. KCl'nin kümülatif dozları (20-100 mM) ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktilesi üzerine Luteolin'in farklı dozlarının etkileri (n=10, P<0.05).

Figure 7. Effects of different doses of Luteolin on *in vitro* bladder smooth muscle contractility induced by cumulative doses (20-100 mM) of KCl (n=10, P<0.05).

60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine Luteolin'in 4×10^{-5} M dozunun etkileri banyoda Nifedipin varlığında ve yokluğunda belirlendi. Banyoda hem Luteolin'in hem de Nifedipin'in ayrı ayrı varlığında KCl ile indüklenen kontraksiyonların önemli ölçüde azaldığı görüldü (Şekil 8, n=10, P<0.001,). Luteolin'in 60 mM KCl ile indüklenen kontraksiyonları Nifedipin'e kıyasla daha güçlü bir şekilde baskıladığı, Nifedipin ile Luteolin'in birlikte uygulamasının ise Luteolin'e göre daha güçlü bir etki oluşturmadığı belirlendi (Şekil 8, n=10, ***: P<0.001).



Şekil 8. 10^{-7} M Nifedipin'in varlığında ve yokluğunda 60 mM KCl ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in (4×10^{-5} M) etkisi (n=10, P<0.001***; KCl: Potasyum klorür; L: Luteolin; N: Nifedipin).

Figure 8. The effect of Luteolin (4×10^{-5} M) on *in vitro* bladder smooth muscle contractions induced by 60 mM KCl in the presence and absence of 10^{-7} M Nifedipine (n=10, P<0.001***; KCl: Potassium chloride; L: Luteolin; N: Nifedipine).

TARTIŞMA ve SONUÇ

CP alternatif tıp alanında yaygın olarak kullanılan çok yıllık bir bitki türüdür (5). Yapısında yüzden fazla biyolojik aktif bileşik bulunduğu rapor edilen (6) CP'nin biyoaktivitesi ile ilgili yapılan araştırmalarda CP ekstraktlarının antimikrobiyal, antiflojistik ve hepatoprotektif aktivitelere sahip olduğu belirlenmiştir (8). CP sulu ekstraktının doza bağımlı olarak *in vitro* fare ve insan midesi antrumunda düz kas kontraksiyonlarını indüklediği rapor edilmiştir (13). CP'nin yapısında bulunan flavonoidlerin ileum üzerinde gevşetici etkili oldukları, aynı zamanda bu flavonoidlerin izole kobay ileumunda Ca^{2+} un hücre içine akımını bloke ederek spazmolitik etki gösterdikleri belirlenmiştir (14,15). Yaptığımız bu çalışmada, ACh ve KCl ile indüklenen *in vitro* rat mesanesi düz kas kontraktilesi üzerine CP metanol ekstraktı ve CP'nin yapısında bulunan Luteolin bileşiğinin muhtemel etkileri araştırıldı.

Çalışmamızda KCl'nin farklı dozları ile kümülatif indüklenen kontraksiyon cevaplarının CP metanol ekstraktının bazı dozları tarafından inhibe edildiği belirlendi. CP ekstraktının farklı dozlarının KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını azaltıcı etkisinin voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden olduğu düşünülmektedir. Çünkü düz kas kontraksiyonları KCl ile indüklendiği zaman ortamda potasyum (K^+) yoğunluğunun artmasına bağlı olarak kas fiberlerinde depolarizasyon oluşmaktadır. Kas fiberlerinde meydana gelen depolarizasyon voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanallarının açılmasına sebep olur. Voltaja duyarlı Ca^{2+} kanallarının açılması aracılığı ile de ekstrasellüler alandan hücre içine Ca^{2+} girişi meydana gelmektedir (24). Ayrıca hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak hücre içi Ca^{2+} depoları olan sarkoplazmik retikulumlardan Ca^{2+} serbest bırakılarak hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonu daha da artırılmaktadır (25). Bu olaylar sonucunda düz kasta kasılma meydana gelmektedir. KCl'nin etkisini özellikle Ca^{2+} kanalları üzerinden gerçekleştiğinden ve CP ekstraktı KCl ile indüklenen kontraksiyonları inhibe ettiğinden çalışmamızda Nifedipin pozitif kontrol olarak kullanıldı ve Nifedipin

ile CP ekstraktının, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını eşit derecede azalttıkları görüldü. Nifedipin ile CP ekstraktının en yüksek dozunu banyoya birlikte uyguladığımızda, KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını daha güçlü bir şekilde azalttıkları belirlendi. Bu durumda CP ekstraktı ile Nifedipin'in birlikte kullanımının etki güçlenmesine neden olabileceği düşünüldü. Bulgularımıza paralel olarak Moradi ve ark. (26) CP etanol ekstraktının 60 mM KCl ile indüklenen izole rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemişler ve bu etkinin voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden olduğunu belirtmişlerdir.

Ürinsasyon esnasında parasempatik kolinerjik sinirlerden, mesane düz kasındaki muskarinik reseptörler üzerindeki bazı bölgelerden ve ürotelyum içinde bulunan non-nöronal hücrelerden ACh salınımı olmaktadır. ACh'nın salınımı sonucunda mesane düz kasında güçlü kontraksiyonlar meydana gelmektedir (27). ACh salınımı, presinaptik sinir terminallerinde bulunan muskarinik 1 (M_1) reseptörlerinin uyarılması sonucunda artarken, muskarinik 2 (M_2) ve muskarinik 4 (M_4) reseptörlerinin uyarılması ile azalmaktadır (28). ACh salınımına neden olan bir diğer etken ise ürotelyumun gerilmesidir. Mesanenin dolma fazında ürotelyum belli bir gerime ulaştığı zaman, ACh salınımı olmakta ve ürinsasyon kontraksiyonları başlatılmaktadır. ACh, muskarinik 3 (M_3) reseptörlerine bağlandığı zaman fosfolipaz C aktive olarak inozitol trifosfat (IP3) oluşumuna neden olmaktadır. IP3 ise sarkoplazmik retikulumdan Ca^{2+} salınımını uyararak kalmodulinin konformasyonel değişime uğramasına yol açmaktadır. Kalmodulinin konformasyonel değişime uğraması sonucunda mesane düz kasında kasılma meydana gelmektedir. Bu mekanizmanın yanı sıra, ACh M_3 reseptörlerine bağlandığı zaman, voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanallarından hücre içine Ca^{2+} girişini artırarak, mesane düz kasının kasılmasını sağlamaktadır (29). Çalışmamızda, CP metanol ekstraktının en düşük dozunun, ACh dozlarının cevaplarını önemli ölçüde değiştirmedeği tespit edildi. Niazmand ve Saberi (30) yaptıkları çalışma neticesinde CP aköz-etanolik

ekstraktının 0.125 mg/ml dozunun izole rat kalp kası kontraktilitelerini önemli bir şekilde azalttığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda CP metanol ekstraktının diğer üç dozunun ise ACh'nın bazı dozlarının cevaplarını azalttıkları belirlendi. Babaei ve ark. (16) yapmış oldukları çalışma ile CP'nin hidroalkolik ekstraktının farklı dozlarının, *in vitro* kobay ileum düz kas kontraksiyonlarını doza bağımlı olarak baskıladıklarını belirlemişlerdir. Borrelli ve ark. (12) ise, CP sulu ekstraktının *in vitro* fare antrum mide düz kas kontraktilitelerini indüklediğini rapor etmişlerdir. Moradi ve ark. (26) CP etanol ekstraktının ACh ile indüklenen izole rat ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemişlerdir. CP ekstraktının farklı dozlarının ACh cevaplarını azaltıcı etkisi M_3 reseptör yolağı, voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalı yolağı veya her iki yolak üzerinden olabilir. CP ekstraktının voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden etkili olabileceği, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyonları üzerine CP ekstraktının etkisi çalışılarak belirlendi. CP ekstraktının voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden etkisinin olmasının yanı sıra, M_3 reseptör yolağı üzerinden de etkili olarak ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını azalttığını belirlemek için voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanal blokörü Nifedipin kullanıldı. Nifedipin ile Ca^{2+} kanalları kapatılarak M_3 yolağı açık bırakıldı. Böylece CP ekstraktının M_3 reseptör yolağı üzerinden de etkili olması durumunda, CP ekstraktının ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevapları üzerine Nifedipin'nin etkisinden daha fazla bir gevşetici etki göstermesi beklendi. Banyoda 10^{-7} M Nifedipin varlığında 10^{-4} M ACh'ya verilen cevapla, banyoda Nifedipin+CP ekstraktı varlığında ACh cevapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi. Dolayısıyla, CP ekstraktının ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraktıl cevaplarını azaltıcı etkisinin, voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanallarının yanı sıra M_3 reseptör yolağı üzerinden de olabileceği düşünüldü.

Luteolin'in en yüksek dozunun KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarını ekseriyetle

azalttığını belirledik. KCl ile indüklenen kontraksiyonlar üzerine Luteolin'in etki mekanizmasının da araştırıldığı çalışmamızda Nifedipin pozitif kontrol olarak kullanıldı ve KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevaplarını Luteolin'in Nifedipin'den daha fazla azalttığı belirlendi. Ayrıca Nifedipin ile Luteolin'in birlikte kullanımının herhangi bir etki güçlenmesine neden olmadığı görüldü. Daha önce yapılmış bir çalışmada Luteolin'in *in vitro* rat vaz deferensinde, kobay ileumu ve trakeasında antispazmodik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (31). Luteolin'in ratlarda kan basıncını düşürücü etkisinin olduğu (32) ve köpeklerde koroner arter direncini azaltarak koroner arterlere kan akışını artırdığı (33) bilinmektedir. Yine Luteolin'in rat torasik aortasında vazodilatasyonu indüklediği ifade edilmektedir (34). Başka bir çalışmada ise, Luteolin'in KCl ile indüklenen *in vitro* rat aort düz kas şeritlerinde kontraksiyon cevaplarını azalttığı ve vazodilatatör etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu etkinin ise hücre dışından hücre içine Ca^{2+} alımının azalmasından olabileceği ifade edilmiştir (35). Bu çalışmaya benzer farklı bir araştırmada ise, Luteolin'in rat torasik aortasında vazorelaksasyona neden olduğu ve bu etkinin Luteolin'in K^+ kanallarının aktivasyonunu ve sarkolemmal Ca^{2+} kanallarını inhibe ederek gerçekleştirdiği belirlenmiştir (36). Bizim çalışmamızın bulguları literatüre paralel olarak Luteolin'in kontraksiyonları inhibe edici etkisinin Ca^{2+} kanalları aracılığıyla olduğu belirlenmiştir.

Luteolin'in bazı dozlarının ACh cevaplarını azalttığını belirlediğimiz bu çalışmamıza benzer şekilde yapılan başka bir çalışmada, Luteolin'in ACh ile indüklenen *in vitro* kobay ileum düz kas kontraksiyon cevaplarını %45 civarında azalttığı belirlenmiştir. Yine bu çalışmada Luteolin'in baryum iyonu tarafından indüklenen *in vitro* kobay trakea düz kas kontraksiyon cevaplarını doza bağlı olarak azalttığı rapor edilmiştir (37). Luteolin'in, ACh cevaplarını azaltıcı etkisinin muhtemel mekanizmalarından birisi Luteolin'in M_3 reseptör yolağını inhibe ederek kontraksiyon cevaplarını

azaltmasıdır. Bunun yanı sıra Luteolin voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanallarını bloke ederek ekstrasellüler bölgeden hücre içine Ca^{2+} girişini veya sarkolemmal Ca^{2+} kanallarını inhibe ederek hücre içi Ca^{2+} depolarından Ca^{2+} salınımını engelleyebilir. Luteolin'in, voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden etkili olabileceği, KCl ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyonları üzerine Luteolin'in etkisi çalışılarak belirlendi. Luteolin'in voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden etkisinin olmasının yanı sıra, M_3 reseptör yolağı üzerinden de etkili olup olmadığını belirlemek için, voltaja duyarlı L tipi Ca^{2+} kanal blokörü Nifedipin kullanıldı. Nifedipin ile Ca^{2+} kanalları kapatılarak M_3 yolağı açık bırakıldı. Böylece Luteolin'in M_3 reseptör yolağı üzerinden etkili olması durumunda, ACh ile indüklenen mesane düz kas kontraksiyon cevapları üzerine Nifedipin'in etkisinden daha fazla bir gevşetici etki göstermesi beklendi. Banyoda Nifedipin varlığında alınan ACh cevapları ile Luteolin ve Nifedipin'in birlikte varlığında alınan cevaplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi. Dolayısıyla, Luteolin'in ACh ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraktıl cevaplarını azaltıcı etkisinin, M_3 reseptör yolağı üzerinden olamayacağı kanısına varıldı.

Sonuç olarak hem CP ekstraktının hem de Luteolin'in bazı dozlarının ACh ve KCl ile indüklenen izole detrüsor düz kas kontraksiyon cevaplarını anlamlı ölçüde inhibe ettikleri, CP ekstraktının bu etkisini L tipi Ca^{2+} kanalları ve M_3 reseptör yolağı üzerinden, Luteolin'in ise kontraksiyonları inhibe edici etkisini L tipi Ca^{2+} kanalları üzerinden gerçekleştirdiği belirlendi.

KAYNAKLAR

1. Passalacqua N., Guarrera P., De Fine G., 2007. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). *Fitoterapia*, 78, 52-68.
2. Pieroni A., Quave CL., 2005. Traditional pharmacopoeias and medicines among Albanians and Italians in southern Italy: A comparison. *J Ethnopharmacol*, 101, 258-270.

3. Judzentiene A., 2016. Atypical Chemical Profiles of Wild Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Essential Oils. *Rec Nat Prod*, 10, 262-268.
4. Nematy M., Mazidi M., Jafari A., Baghban S., Rakhshandeh H., Norouzy A., Esmaily H., Etemad L., Patterson M., Mohammadpour AH., 2017. The effect of hydro-alcoholic extract of *Achillea millefolium* on appetite hormone in rats. *Avicenna J Phytomed*, 7, 10-15.
5. Lakshmi T., Geetha R., Roy A., Aravind Kumar S., 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) A Herbal Medicinal Plant with Broad Therapeutic Use-A Review. *Int J Pharm Sci Rev Res*, 9, 136-141.
6. Nemeth E., Bernath J., 2008. Biological activities of yarrow species (*Achillea* spp.). *Curr Pharm Des*, 14, 3151-3167.
7. Barut N., Barut B., Engin S., Yıldırım S., Yaşar A., Türkiş S., Özel A., Sezen FS., 2017. Antioxidant capacity, anti-acetylcholinesterase activity and inhibitory effect on lipid peroxidation in mice brain homogenate of *Achillea millefolium*. *Turk J Biochem*, 42, 493-502.
8. Ahmadi-Dastgerdi A., Ezzatpanah H., Asgary S., Dokhani S., Rahimi E., 2017. Phytochemical, antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil from flowers and leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium*. *J Essent Oil Bear PI*, 20, 395-409.
9. Yaeesh S., Jamal Q., Khan AU., Gilani AH., 2006. Studies on hepatoprotective, antispasmodic and calcium antagonist activities of the aqueous-methanol extract of *Achillea millefolium*. *Phytother Res*, 20, 546-551.
10. Khan AU., Gilani AH., 2011. Blood pressure lowering, cardiovascular inhibitory and bronchodilatory actions of *Achillea millefolium*. *Phytothe Res*, 25, 577-583.
11. Ali Sl., Gopalakrishnan B., Venkatesalu V., 2017. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: A Review. *Phytother Res*, 31, 1140-1161.
12. Borrelli F., Romano B., Fasolino I., Tagliatella Scafati O., Aprea G., Capasso R., Capasso F., Coppola Bottazzi E., Izzo A., 2012. Prokinetic effect of a standardized yarrow (*Achillea millefolium*) extract and its constituent choline: studies in the mouse and human stomach. *J Neurogastroenterol Motil*, 24,164-190.
13. Benedek B., Gjoncaj N., Saukel J., Kopp B., 2007. Distribution of phenolic compounds in middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. *Chem Biodivers*, 4, 849-857.
14. Barnes J., Anderson LA., Phillipson JD., 2003. *Herbal Medicines: A Guide for Healthcare Professionals*. Pharmaceutical Press, London.
15. Lemmens-Gruber R., Marchart E., Rawnduzi P., Engel N., Benedek B., Kopp B., 2006. Investigation of the spasmolytic activity of the flavonoid fraction of *Achillea millefolium* on isolated guinea-pig ilea. *Arzneimittelforschung*, 56, 582-588.
16. Babaei M., Abarghoei ME., Akhavan MM., Ansari R., Vafaei AA., Taherian AA., Mousavi S., Toussy J., 2007. Antimotility effect of hydroalcoholic extract of yarrow (*Achillea millefolium*) on the guinea-pig ileum. *Pak J Biol Sci*, 10, 3673-3677.
17. Packer L., Sies H., 2001. *Flavonoids and Other Polyphenols: Methods in Enzymology*. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
18. Kasala ER., Bodduluru LN., Barua CC., Gogoi R., 2016. Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo (a) pyrene-induced experimental lung carcinogenesis. *Biomed Pharmacother*, 82, 568-577.
19. Naso LG., Lezama L., Valcarcel M., Salado C., Villace P., Kortazar D., Ferrer EG., Williams PA., 2016. Bovine serum albumin binding, antioxidant and anticancer properties of an oxidovanadium (IV) complex with luteolin. *J Inorg Biochem*, 157, 80-93.
20. Lemanska K., van der Woude H., Szymusiak H., Boersma MG., Gliszczynska-Swiglo A., Rietjens IM., Tyrakowska B., 2004. The effect of catechol O-methylation on radical scavenging characteristics of quercetin and Luteolin-A

- mechanistic insight. Free Radic Res, 38, 639-647.
21. Qi L., Pan H., Li D., Fang F., Chen D., Sun H., 2011. Luteolin improves contractile function and attenuates apoptosis following ischemia-reperfusion in adult rat cardiomyocytes. Eur J Pharmacol, 668, 201-207.
 22. Philyppov IB., Paduraru ON., Gulak KL., Skryma R., Prevarskaya N., Shuba YM., 2016. TRPA1-dependent regulation of bladder detrusor smooth muscle contractility in normal and type I diabetic rats. J Smooth Muscle Res, 52, 1-17.
 23. Şengül E., Çelebi F., Gelen V., Çınar A., 2017. The effects of rosmarinus officinalis (rosemary) aqueous extract on smooth muscle contractions in isolated rat urinary bladder. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 12, 130-136.
 24. Karaki H., Ozaki H., Hori M., Mitsui-Saito M., Amano KI., Harada KI., Miyamoto S., Nakazawa H., Won KJ., Sato K., 1997. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. Pharmacol Rev, 49, 157-230.
 25. Anderson KE., 1993. Pharmacology of lower urinary tract smooth muscles and penile erectile tissues. Pharmacol Rev, 45, 253-308.
 26. Moradi M., Rafieian-Koupaei M., Imani-Rastabi R., Nasiri J., Shahrani M., Rabiei Z., Alibabaei Z., 2013. Antispasmodic effects of yarrow (*Achillea millefolium* L.) extract in the isolated ileum of rat. Afr J Tradit Complement Altern Med, 10, 499-503.
 27. Abrams P., Andersson KE., Buccafusco JJ., Chapple C., Groat WC., Fryer AD., Kay G., Laties A., Nathanson NM., Pasricha PJ., 2006. Muscarinic receptors: Their distribution and function in body systems, and the implications for treating overactive bladder. Br J Pharmacol, 148, 565-578.
 28. Chess-Williams R., 2002. Muscarinic receptors of the urinary bladder: detrusor, urothelial and prejunctional. Auton Autacoid Pharmacol, 22, 133-145.
 29. Andersson KE., Wein AJ., 2004. Pharmacology of the lower urinary tract: basis for current and future treatments of urinary incontinence. Pharmacol Rev, 56, 581-631.
 30. Niazmand S., Saberi Z., 2010. The chronotropic and inotropic effects of aqueous-ethanolic extract of *Achillea millefolium* on rat's isolated heart. Pharmacologyonline, 3, 791-798.
 31. Van Den Broucke C., Lemli J., 1983. Spasmolytic activity of the flavonoids from *Thymus vulgaris*. Pharm Weekbl, 5, 9-14.
 32. Wang L., Han C., Wang P., 1986. Experimental study on hypotensive effect of semi-synthesis luteolin. Chin Pharmacol Bull, 2, 34-36.
 33. Wang L., Han C., Wang P., 1992. Experiment research on luteolin affecting coronary circulation dynamics. Chin Pharmacol Bull, 8, 388-390.
 34. Chan EC., Pannangpetch P., Woodman OL., 2000. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action structure-activity relationships. J Cardiovasc Pharmacol, 35, 326-333.
 35. Duarte J., Vizcaino FP., Utrilla P., Jimenez J., Tamargo J., Zarzuelo A., 1993. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. Gen Pharmacol: The Vascular System, 24, 857-862.
 36. Jiang H., Xia Q., Wang X., Song J., Bruce IC., 2005. Luteolin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via calcium and potassium channels. Pharmazie - Int J Pharm Sci, 60, 444-447.
 37. Fleer H., Verspohl E., 2007. Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. Phytomedicine, 14, 409-415.



Ratlarda Cyclophosphamide ile İndüklenen Hemorajik Sistitte Mesane Kontraktilitesi ve Histopatolojisi Üzerine Rutin'in Etkileri

Volkan GELEN¹✉, Emin ŞENGÜL², Serkan YILDIRIM³, Fikret ÇELEBİ², Ali ÇINAR²

1. Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.
2. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
3. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
25.12.2017	04.05.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Gelen V, Şengül E, Yıldırım S, Çelebi F, Çınar A: Ratlarda Cyclophosphamide ile İndüklenen Hemorajik Sistitte Mesane Kontraktilitesi ve Histopatolojisi Üzerine Rutin'in Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 337-346, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.370609

Öz: Bu çalışmada, ratlarda Cyclophosphamide (CP) ile indüklenen hemorajik sistitte izole mesane düz kas kontraksiyonları ve mesane histopatolojisi üzerine Rutin'in etkileri araştırıldı. Çalışmada 24 adet erişkin dişi Sprague Dawley rat kullanıldı ve ratların ağırlıkları ortalama 200-250 gramdı. Dört deney grubu oluşturuldu ve her bir grupta 6 rat vardı. Kontrol ve CP grubuna 7 gün intraperitoneal (ip) serum fizyolojik uygulandı. Ayrıca, CP grubuna serum fizyolojik uygulamasının 5. günü tek doz CP (150 mg/kg, ip) enjekte edildi. Rutin uygulanan gruplara serum fizyolojikte çözdürülmüş Rutin (50 mg/kg, ip) 7 gün enjekte edildi. Rutin+CP grubuna, Rutin uygulamasının 5. günü tek doz CP uygulandı. Deneysel uygulamanın 8. günü ratlar anestezi eşliğinde dekapite edilerek mesaneleri izole edildi. İzole mesane düz kas şeritlerinde Asetilkolin (ACh) (10^{-4} M) ve Potasyum Klorür (KCl) (60 mM) ile indüklenen kontraksiyon değerleri elde edildi. Ayrıca mesaneler hematoksilen eozin ile boyanarak histopatolojik değerlendirme yapıldı. CP grubundaki ratlarda ACh ve KCl ile indüklenen *in vitro* kontraksiyonların arttığı fakat istatistiksel önem arz etmediği ($P>0.05$) ve Rutin uygulamasının artan kontraksiyon cevaplarını azalttığı belirlendi. Histopatolojik incelemede mesane lümeninde epitel döküntü, mukoza epitelinde deskuamasyon, koagulasyon nekrozu ve şiddetli düzeyde eritrosit görülürken, Rutin'in bu değişiklikleri azalttığı görüldü. Sonuç olarak; CP ile indüklenen hemorajik sistitte mesane kontraktilitesi ve histopatolojisi üzerine Rutin uygulamasının protektif etkili olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Histopatoloji, Rutin, Siklofosfamid, Sistit, Rat.

Effects of Rutin on Bladder Contractility and Histopathology in Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats

Abstract: In this study, the effects of Rutin on the isolated urinary bladder smooth muscle contractions and bladder histopathology in Cyclophosphamide (CP)-induced hemorrhagic cystitis in rats were investigated. In study, twenty-four adult female Sprague Dawley rats were used and the average weight of the rats was 200-250 g. Four experimental groups were formed and each group had 6 rats. The control and CP groups were administered intraperitoneally (ip) physiologic saline solution for 7 days. Also, CP group was injected the single dose of CP (150 mg/kg, ip) on the fifth day of saline administration. The Rutin application groups, Rutin (50 mg/kg, ip) dissolved in physiological saline were injected for 7 days. The Rutin+CP group was administered a single dose of CP on the fifth day of Rutin administration. On the 8th day of the experimental procedure, the rats were decapitated in the presence of anesthesia and their bladders were isolated. The contraction values induced by Acetylcholine (ACh) (10^{-4} M) and Potassium Chloride (KCl) (60 mM) in isolated bladder smooth muscle strips were obtained. Besides, urinary bladders were performed the histopathologic evaluation by staining with hematoxylin eosin. It was determined that the increased *in vitro* contractions induced by ACh and KCl in the CP group rats but not statistically significant ($P>0.05$) and Rutin administration was reduced the increased contraction responses. Histopathological examination was seen that Rutin reduced these changes while epithelial rash in the bladder lumen, desquamation in the mucosal epithelium, coagulation necrosis and severe erythrocyte. In conclusion, in CP-induced hemorrhagic cystitis was determined to be a protective effect of Rutin application on bladder contractility and histopathology.

Keywords: Cyclophosphamide, Cystitis, Histopathology, Rat, Rutin.

✉ Volkan GELEN

Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Kars, TÜRKİYE.
e-posta: gelen_volkan@hotmail.com

GİRİŞ

Kemoterapotik ajanlar temel olarak malignitelerin tedavisinde kullanılırlar (1). Antikanser bir ajan olan Cyclophosphamide (CP) meme ve akciğer kanseri, sistemik lupus eritematozus, romatoid artrit ve multiple sklerozis gibi malignite ve hastalıkların tedavisinde sıklıkla başvurulan bir kemoterapotiktir (2). CP'nin hepatotoksisite (3), nefrotoksisite (4), kardiyotoksisite (5), akciğer toksisitesi (6) ve gonadal toksite (7) gibi yan etkileri bu ajanın kullanımını sınırlamaktadır. CP'nin metaboliti olan akrolein bileşiği, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve lipid peroksidasyonunun artmasına sebep olmaktadır (8). Akrolein bileşiği doku ve hücrelerde toksik etkilere sebep olurken, CP'nin antineoplastik etkileri fosforamid mustartı ile oluşmaktadır (9). CP'nin farklı organ toksisitelerinin yanı sıra, hemorajik sistit, mesane fibrozisi ve nekrozu gibi ürolojik yan etkileri de bulunmaktadır (10,11). CP'nin indüklediği hemorajik sistitin oluşum mekanizmasının tam olarak bilinmemesine karşın, akrolein bileşiğinin oksidatif stresi indükleyerek sistit oluşumuna neden olduğuna inanılmaktadır (12). CP ile indüklenen hemorajik sistit, mesane kapasitesinde azalma, mesane düz kasının kontraksiyonlarında artma ve küçük volümlerde sık ürinyasyon ile karakterizedir (13,14). Ayrıca mesanede ciddi ödem oluşumu ve mukozal hematumlu hemorajiler belirlenen değişikliklerden bazılarıdır (15). Son yıllarda antikanser ajanların organizmadaki yan etkileri üzerine bitkilerin yapısında bulunan biyolojik aktif bileşiklerin etkileri ile alakalı yoğun bir şekilde çalışmalar yapılmaktadır. Bitkilerin yapısında bulunan flavonoidler (16), antikanserojen ajanların yan etkilerinin önlenmesinde veya azaltılmasında ve farklı sebeplerle oluşan serbest radikallerin detoksifikasyonunda önemli rol oynarlar (17). Meyve sularının ve sebzelerin yapısında bolca bulunan Rutin bir flavonoid bileşik olup, antiinflamatuvar (18),

antitümör (19), antimitojenik (20), bağışıklık sistemini düzenleyici (21) ve kalp kasını koruyucu (22) etkileri vardır. Rutin bileşiğinin antikanserojen ajanların yan etkilerini önleyici veya azaltıcı etkileri bilinmektedir. Rutin uygulamasının, CP ile indüklenen reproduktif toksisiteyi (23), oksidatif stresi ve inflamasyonu (24) azalttığı rapor edilmiştir. Literatür taramalarımız sonucunda, ratlarda CP ile indüklenen hemorajik sistitte Rutin'in etkileri ile alakalı bir araştırmaya rastlanılmamıştır. Bu doğrultuda yapmış olduğumuz çalışmada, CP ile indüklenen hemorajik sistitte, mesane düz kas kontraktilesi ve mesane histopatolojisi üzerine güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bir bileşik olan Rutin'in etkilerinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu Başkanlığı tarafından onaylandı (Karar No: 2013/131).

Kullanılan Deneyle Hayvanları

Çalışmada Sprague Dawley cinsi ağırlıkları ortalama 200-250 gr olan 24 adet erişkin gebe olmayan dişi rat kullanıldı. Ratlar Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve deney gününe kadar bu merkezde barındırıldı. Bütün hayvanlar standart laboratuvar şartlarına tabi tutulup su ve yem ad libitum verildi.

Deneysel Uygulamalar

Her bir grup 6 adet rat olmak üzere Kontrol, CP, Rutin+CP ve Rutin olmak üzere dört ana deney grubu oluşturuldu. Kontrol grubuna 7 gün boyunca intraperitoneal (ip) serum fizyolojik enjekte edildi. CP grubuna 7 gün ip serum fizyolojik uygulandı ve uygulamanın 5. günü tek doz CP (150 mg/kg, ip) enjekte edildi. Rutin+CP grubundaki ratlara 7 gün serum fizyolojikte çözdürülmüş Rutin (50mg/kg, ip)

uygulandı ve Rutin uygulamasının 5. günü tek doz CP (150 mg/kg, ip) verildi. Rutin grubunun ratlarına ise 7 gün serum fizyolojikte çözdürülmüş Rutin (50mg/kg, ip) uygulaması yapıldı. Deneysel uygulamaların 8. Günü (CP enjeksiyonundan 72 saat sonra) ratlar ketamin hidroklorür (Ketalar: 75mg/kg) ve ksilazin (Rompun: 15 mg/kg) anestezisi eşliğinde servikal dislokation yöntemi ile ötenazi edildiler.

İzole Mesane Kesitlerinin Hazırlanması ve *In Vitro* Kasılımların Değerlendirilmesi

Dekapite edilen ratların mesaneleri izole edilerek içerisinde +4 °C sıcaklığında Krebs solüsyonu (mM: NaCl,113; KCl 4.7; NaHCO₃, 19.8; KH₂PO₄, 1.2; MgCl₂, 2.5; CaCl₂, 1.7; glukoz, 11.1; pH, 7.4) bulunan petri kutusuna alınarak seroza ve bağ dokusu temizlendi. Daha sonra mukoza tabakası hafifçe kazınarak kas dokusundan ayrıldı ve mesanelerden iki adet 2x10 mm ebatlarında düz kas şeritleri hazırlandı. Elde edilen kas şeritleri içerisinde sıcaklığı 37°C ve pH'sı 7.4 olan Krebs solüsyonu bulunan, %95 O₂ ve %5 CO₂ gaz karışımı ile sürekli gazlandırılan, 20 ml'lik organ banyosuna asıldı. Kesitlere 1 g gerim uygulandı ve 1 saatlik inkübasyon periyoduna maruz bırakıldı. Bu süre içerisinde her 15 dk'da bir banyonun Krebs solüsyonu yenisi ile değiştirildi (25). İnkübasyon periyodu sonunda ACh ve KCl'nin önceki çalışmalarımızda belirlemiş olduğumuz submaksimal dozları olan sırasıyla 10⁻⁴ M ve 60 mM dozları banyoya uygulanarak izometrik kasılımlar kaydedildi. Elde edilen kasılım değerleri gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirildi.

Histopatolojik Muayane

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan rat mesanelerine ait doku örnekleri %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildi. Rutin doku takip işlemleri sonucu parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 µm kalınlığında kesitler alındı.

Histopatolojik inceleme için hazırlanan preparatlar hematoksilen-eozin (HE) ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Leica DM 1000, Germany). Kesitler histopatolojik bulgulara göre yok (-), hafif (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 20 istatistik programında yapıldı. İzole organ deneylerinden elde edilen veriler One Way ANOVA'da Tukey testi ile değerlendirildi. Değerler, ortalama±SD olarak verildi. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesinde de Kruskal-Wallis testi kullanıldı. P<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Deney gruplarındaki ratların mesane dokuları makroskobik olarak incelendiğinde, kontrol grubundaki ratların mesane dokularının fizyolojik görünümüne sahip olduğu ve herhangi bir değişiklik olmadığı belirlendi. CP grubunun mesane dokuları makroskobik olarak incelendiğinde, mesane dokusunda ödemeleşme olduğu, kızarıklık meydana geldiği ve mesane duvar kalınlığının arttığı gözlemlendi. Ayrıca CP grubundaki ratların mesane dokusu ebatlarının diğer gruplardan daha büyük olduğu görüldü. Rutin uygulamasının bu değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı görüldü.

ACh ve KCl ile İndüklenen Mesane Kontraksiyonları

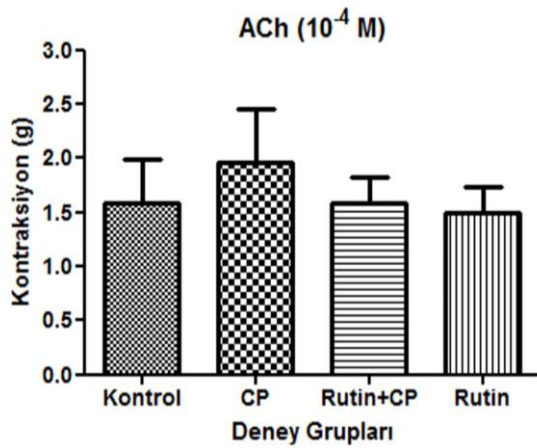
Hemorajik sistitli ratların mesane düz kas şeritlerinin spontan kasılımlarının arttığı gözlemlendi. ACh ve KCl ile indüklenen kontraksiyon cevaplarının CP grubunda arttığı fakat istatistiksel önem arz etmediği belirlendi (Tablo 1, Şekil 1 ve 2, P>0.05). Rutin uygulaması yapılan gruplarda ACh ve KCl ile indüklenen kontraksiyonların CP grubuna göre azaldığı ancak diğer gruplardan farklı olmadığı tespit edildi (Tablo 1, Şekil 1 ve 2, P>0.05).

Tablo 1. Deney gruplarının *in vitro* mesane düz kaslarında ACh (10^{-4} M) ve KCl (60 mM) ile indüklenen kontraksiyon cevaplarının değerleri (n=6).

Table 1. The values of contraction responses induced by ACh (10^{-4} M) and KCl (60 mM) at *in vitro* urinary bladder smooth muscle of experimental groups (n=6).

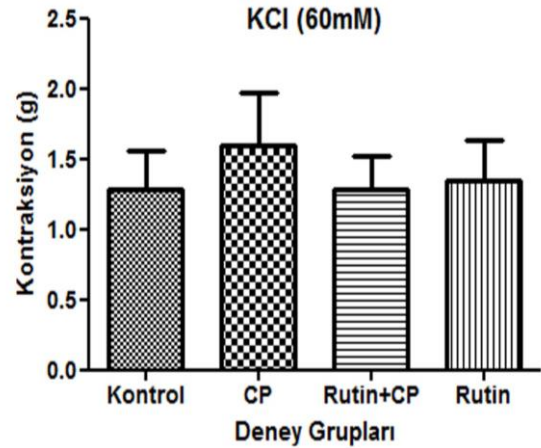
	Deney Grupları				P Değeri (n=6)
	Kontrol $\bar{X} \pm SD$	CP $\bar{X} \pm SD$	Rutin+CP $\bar{X} \pm SD$	Rutin $\bar{X} \pm SD$	
ACh	1.59±0.39	1.96±0.49	1.5±0.24	1.58±0.25	P>0.05
KCl	1.27±0.27	1.6±0.38	1.35±0.25	1.27±0.24	P>0.05

CP: Cyclophosphamide, ACh: Asetilkolin, KCl: Potasyum klorür, SD: Standart deviation



Şekil 1. Deney gruplarının *in vitro* mesane düz kaslarında ACh (10^{-4} M) ile indüklenen kontraksiyon cevapları. (n=6)

Figure 1. The contraction responses induced by ACh (10^{-4} M) in *in vitro* urinary bladder smooth muscle of experimental groups. (n=6)



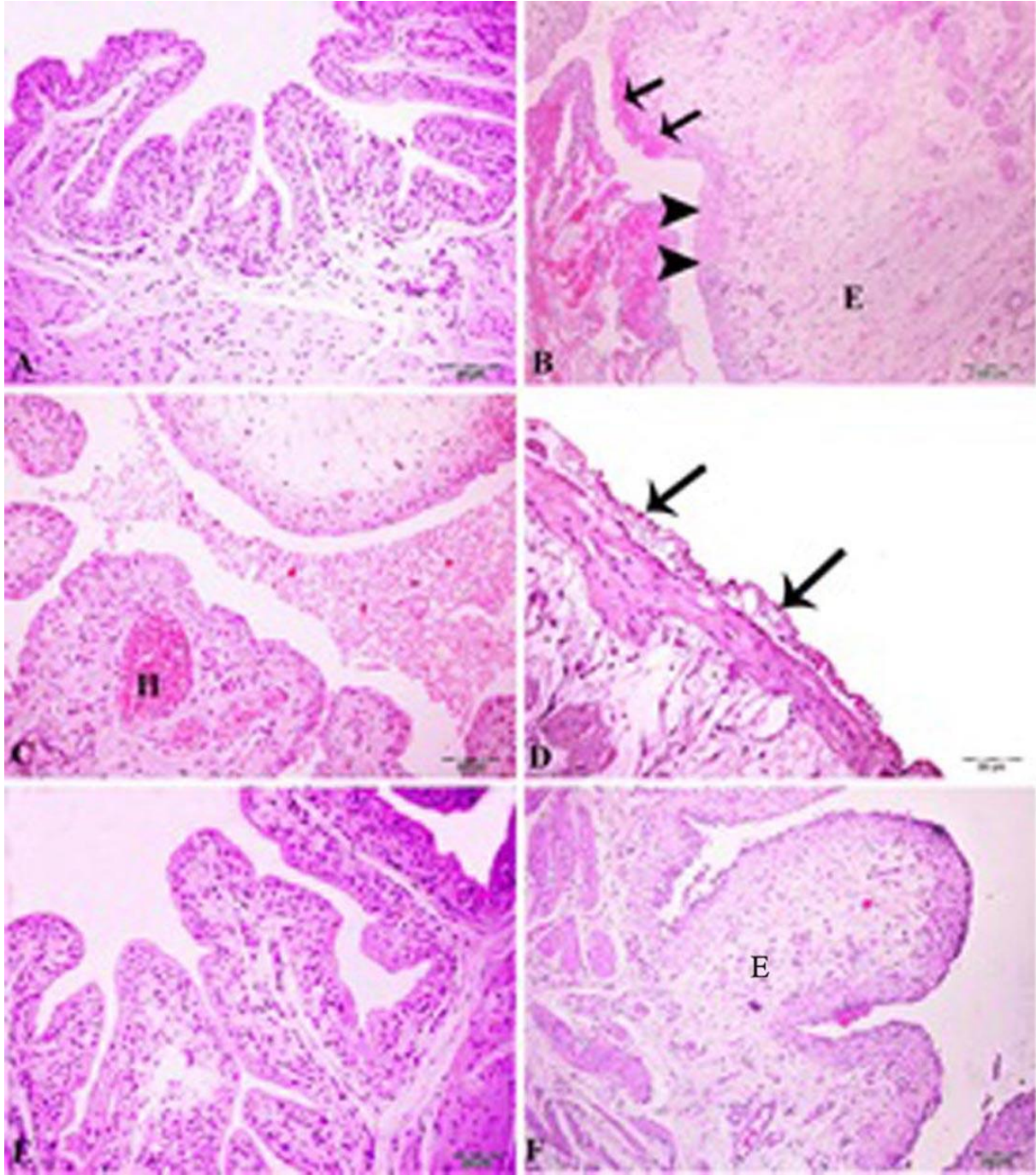
Şekil 2. Deney gruplarının *in vitro* mesane düz kaslarında KCl (60 mM) ile indüklenen kontraksiyon cevapları. (n=6)

Figure 2. The contraction responses induced by KCl (60 mM) in *in vitro* urinary bladder smooth muscle of experimental groups. (n=6)

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubunun mesane dokuları incelendiğinde normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 3-A). CP grubunun mesane dokuları incelendiğinde, mesane lümeninde döküntü, mukoza epitelinde şiddetli düzeyde eritrosit görüldü (Şekil 3-B). Yalancı çok katlı mukoza epitelinin kübik epitele dönüştüğü ve mukozanın epitel hücrelerinde deskuamasyon ve koagülasyon nekrozu belirlendi (Şekil 3-C). Propria mukozada şiddetli ödeme, damarlarda şiddetli hiperemi ve kanamalara rastlandı

(Şekil 3-B). Musküler tabakada ödem ve damarlarda hiperemi, serozada ödematöz kalınlaşma ve damarlarda şiddetli hiperemi tespit edildi (Şekil 3-D). Rutin+CP grubunun mesane dokuları incelendiğinde, mukoza epitelinde hafif deskuamasyon ve tek katlı epitele dönüştüğü görüldü. Lamina propria orta düzeyde ödem, ve damarlarda hiperemi görüldü (Şekil 3-F). Rutin grubunda ise mukoza, lamina propria, lamina mükölaris ve serozanın normal histolojik yapıda olduğu tespit edildi (Şekil 3-E). Histopatolojik bulgular Tablo 2’de özetlendi.



Şekil 3. Mesane dokusu, Kontrol grup-A, normal histolojik görünümü; CP grup-B, lamina epitelialiste nekroz (ok başları), şiddetli kanama (oklar), lümende yoğun miktarda eritrosit ve döküntü epiteller, şiddetli ödem (E) Bar: 100 µm; CP grup-C, damarlarda şiddetli hiperemi (H) ve hemoraji, lamina eptelyalis kübik epitele dönüşmüş; CP grup-D, Serozada ödem (oklar), damarlarda hiperemi; Rutin grup-E, normal histolojik yapı; CP+Rutin grup-F, lamina propriada orta düzeyde ödem, damarlarda hiperemi, H&E, Bar: 50 µm.

Figure 3. Urinary bladder tissue, Control group-A, normal histological appearance; CP group-B, in the lamina epithelialis necrosis (arrowheads), severe bleeding (arrows), mass erythrocyte and erythema epithelium in lumen, severe edema (E) Bar: 100 µm; CP group-C, Severe hyperemia (H) in veins and hemorrhage, laminae eptelyalis transformed into cubic epithelium; CP group-D; edema (arrows)in serosa, hyperemia in vessels; Rutin group-E, normal histological structure; CP+Rutin group-F, middle edema in lamina propria, hyperemia in vessels, H&E, Bar: 50 µm.

Tablo 2. Histopatolojik bulguların değerlendirilmesi.
Table 2. Evaluation of histopathological findings.

		Kontrol	CP	Rutin+CP	Rutin
Mukozada	Deskuamasyon	-	+++	++	-
	Erezyon				
	Koagulasyon nekrozu	-	++	-	-
	Damarlarda hiperemi	-	+++	++	-
Lamina Propria	Kanama	-	+++	+	-
	Ödem	-	+++	++	-
Lamina Muskularis	Damarlarda hiperemi	-	+++	+	-
	Ödem	-	+++	-	-
	Damarlarda hiperemi	-	+++	+	-
	Ödem	-	++	-	-
	Damarlarda hiperemi	-	+++	+	-

CP: Cyclophosphamid

TARTIŞMA ve SONUÇ

CP gibi antikanserojenlerin tedavi etkinliği, bu ilaçların mevcut yan etkilerinden dolayı sınırlanmaktadır (26). Son zamanlarda yapılan araştırmalarda antikanser ajanların yan etkilerinin azaltılması veya önlenmesi amacıyla bitkilerin yapısında bulunan farklı bileşikler sıklıkla kullanılmaktadır (27,28). Bu amaçla kullanılan flavonoid bileşiklerden birisi Rutin'dir (23,24). Bu çalışmada CP ile indüklenen hemorajik sistitte *in vitro* mesane düz kas kontraktilitesi ve mesane histopatolojisi üzerine Rutin'in etkileri belirlendi.

Organizmada çeşitli yan etkilere sahip olduğu bilinen (3-8) CP'nin yan etkilerinden birisi de hemorajik sistittir (11). CP ile indüklenen hemorajik sistitte mesane dokusunda etkilenen mekanizmalar arasında mesane kontraktilitesi de bulunmaktadır. CP'nin toksik bileşiği olan akroleinin farklı dozlarının doza bağımlı olarak *in vitro* mesane düz kasında kontraksiyonları indüklediği belirlenmiştir (13). Mesane düz kas kontraktilitesi üzerine CP'nin *in vivo* etkilerinin araştırıldığı başka bir çalışmada CP uygulamasından 60 saat sonra karbakol ile uyarılan izole detrusor cevaplarının EC50 değerlerinin yaklaşık

%60 oranında azaldığı tespit edilmiştir (14). Sivri farelerin (*Suncus murinus*) mesanelerinde CP'nin akut etkilerinin araştırıldığı bir diğer araştırmada ise, karbakol ile indüklenen kontraktıl cevaplar değerlendirilmiş ve karbakol cevaplarının CP uygulaması ile azaldığı belirlenmiştir (29). Mevcut araştırmamızda literatür bilgilerin aksine hem ACh hem de KCl ile indüklenen *in vitro* mesane düz kas kontraksiyon cevaplarının CP grubunda kontrol ve diğer gruplardan daha fazla olduğu, ancak kontraksiyon cevaplarındaki bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi. Elde ettiğimiz bulgular ile literatür farklılığının, diğer araştırmalarda mesane mukozasının bütünlüğü korunurken bizim çalışmamızda mukoza bütünlüğünün bozulmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Anderson MC ve ark. (30) CP ile indüklenen sistitli mesane dokularında bir muskarinik reseptör agonisti olan Metkolin ile indüklenen kontraksiyonların mukozasız mesanelerde daha güçlü olduğunu tespit etmişlerdir. Mesane mukozasından salınan nitrik oksit (NO) mesanede hem fizyolojik hem patolojik durumlarda önemli rol oynar (31-33). Özellikle inflamasyon esnasında mukozadan salınımı artan NO'nin, mesane kontraksiyonlarını etkilediği ve kontraksiyon

cevaplarını azaltıcı etkili olduğu bildirilmektedir (30). Hem Giglio D ve ark. (14) hem de Mok MH ve ark.'nın (29) yapmış oldukları çalışmalarda CP ile sistit oluşturulmuş deney hayvanlarının mesane dokularında mukoza tabakasının bütünlüğünü bozmadan kontraktıl cevapları değerlendirilmiştir. İnflamasyonlu mesanelerden NO salınımı arttığından ve NO'nun kontraktıl cevapları azalttığından, CP grubunda kontraksiyon cevaplarının kontrol grubundan düşük olması bu durumun bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu mekanizmalardan dolayı bizim çalışmamızda mesane mukozasının ortadan kaldırılması ile NO salınımının azaldığı, buna bağlı olarak ACh ve KCl ile indüklenen kontraksiyonların daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

Deney gruplarındaki ratların mesane dokularının makroskobik incelemesi yapıldığında, CP grubunun mesane dokularında ödemleşme olduğu, hemorajiler meydana geldiği ve mesane duvar kalınlığının arttığı gözlemlendi. Ayrıca CP grubundaki ratların mesane dokularının ebatları diğer gruplardakinden daha büyüktü. Rutin uygulamasının ise bu değişiklikleri önemli ölçüde azalttığı görüldü. Elde ettiğimiz makroskobik bulgular, Giglio D ve ark.'nın (14) bulguları ile uyumluydu. Hemorajik sistitte mesane dokularının mikroskobik incelemeleri sonucunda ürotelyumda hasar, transmural ödem, hemoraji, mukozada ülserasyon ve epitelial nekroz gibi bulgular şekillenmekte ve bu değişikliklerin genellikle, CP'nin tek doz kullanımından 24 saat sonra ortaya çıktığı ifade edilmektedir (34). Bunların yanı sıra hemorajik sistitin patogenezinde iNOS oluşumu ve bunun sitokin oluşumunu indüklediği rapor edilmiştir (35). İnflamasyonlu mesane dokusunda artan NO seviyeleri, dokuda hasara neden olmaktadır (36,37). CP'nin neden olduğu mesane inflamasyonunda mast hücre sayısında artış olduğu ve CP ile indüklenen sistitin patogenezinde önemli bir rol oynayan NO'nun salınımında artış meydana geldiği belirlenmiştir (38). Artan NO salınımı ile plazma proteinlerinin hücreler arasına sızması sonucu dokuda ödem şekillenmesi görülmektedir ki

bu durum genellikle CP uygulamasından 45 veya 60 saat sonra oluşmaktadır (39). Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda çeşitli antioksidanların kullanımı ile CP'nin neden olduğu hemorajik sistitin önlenmesine dair bilgiler mevcuttur (40). Güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkili oldukları bilinen flavonoid bileşikleri meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunurlar ve bu bileşikler ksantin oksidaz (41) ve protein kinase C (42) gibi çeşitli enzimlerin aktivitesini inhibe ederek süperoksit oluşumunu önlerler. Flavonoidlerin siklooksijenaz, lipooksijenaz, mikrozomal monooksijenazı inhibe ettiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar ile Rutin'in, CP uygulaması sonucunda karaciğerde (24) ve doxorubicin ile testislerde (43) oluşan doku hasarları ve oluşan histopatolojik değişiklikler üzerine önemli düzeyde koruyucu ve düzeltici etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda CP uygulamasını mesane lümeninde döküntü, mukoza epitelinde şiddetli düzeyde eritrosit varlığı, mukoza epitelinde deskuamasyon, koagülasyon nekrozunun oluşması ve Rutin uygulamasının bu değişiklikleri azaltması literatür ile uyumludur.

Sonuç olarak, birçok bitkinin yapısında bulunan, güçlü antioksidan ve antiinflamatuvar etkili bir flavonoid olan Rutin'in, ratlarda CP ile indüklenen hemorajik sistitte mesane kontraktilesi ve histopatolojisi üzerine protektif etkili olduğu belirlendi.

KAYNAKLAR

1. Rashid S., Ali N., Nafees S., Hasan SK., Sultana S., 2014. Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in wistar rats. *Food Chem Toxicol*, 66, 185-193.
2. Mahmoud AM., Hussein OE., Ramadan SA., 2013. Amelioration of cyclophosphamide-induced hepatotoxicity by the brown seaweed *Turbenaria ornata*. *Int J Clin Pharmacol Toxicol*, 11, 9-17.
3. Cuce G., Çetinkaya S., Koc T., Esen HH., Limandal C., Balcı T., Klakan S., Aköz M., 2015. Chemoprotective effect of vitamin E in

- cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats. *Chem Biol Interact*, 232, 7-11.
4. Said E., Elkashef WF., Abdelaziz RR., 2015. Tranilast ameliorates cyclophosphamide-induced lung injury and nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol*, 944, 347-358.
 5. Conklin DJ., Haberzettl P., Jagatheesan G., Baba S., Merchant ML., Prough R. A., Williams JD., Sumanth DP., Bhatnagar A., 2015. Glutathione S-transferase P protects against cyclophosphamide-induced cardiotoxicity in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2852, 136-148.
 6. Şengül E., Gelen V., Gedikli S., Özkanlar S., Gür C., Çelebi F., Çınar A., 2017. The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats. *Biomed Pharmacother*, 92, 303-307.
 7. Zanchi MM., Manfredini V., dos Santos Brum D., Vargas LM., Spiazzi CC., Soares MB., Izaguirry AP., Santos FW., 2015. Green tea infusion improves cyclophosphamide-induced damage on male mice reproductive system. *Toxicol Rep*, 2, 252-260.
 8. Liu F., Li XL., Lin T., He DW., Wei GH., Liu JH., Li LS., 2012. The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeleton changes and oxidative stress in sertoli cells. *Mol Biol Rep*, 39, 493-500.
 9. Kim SH., Lee IC., Lim JH., Moon C., Bae CS., Kim SH., Shin DH., Park SC., Kim HC., Kim JC., 2012. Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats, *Food Chem Toxicol*, 50, 109-115.
 10. Levine LA., Richie JP., 1989. Urological complications of cyclophosphamide. *J Urol*, 141, 1063-1069.
 11. Kim SH., Lee IC., Ko JW., Moon C., Kim SH., Shin IS., Seo YW., Kim HC., Kim JC., 2015. Diallyl disulfide prevents cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats through the inhibition of oxidative damage, MAPKs, and NF- κ B pathways. *Biomol Ther*, 23, 180-188.
 12. Kiuchi H., Takao T., Yamamoto K., Nakayama J., Miyagawa Y., Tsujimura A., Nonomura N., Okuyama A., 2009. Sesquiterpene lactone parthenolide ameliorates bladder inflammation and bladder overactivity in cyclophosphamide induced rat cystitis model by inhibiting nuclear factor-kappa B phosphorylation. *J Urol*, 18, 2339-2348.
 13. Ahluwalia A., Maggi CA., Santicioli P., Lecci A., Giuliani S., 1994. Characterization of the capsaicin-sensitive component of cyclophosphamide-induced inflammation in the rat urinary bladder. *Br J Pharmacol*, 111, 1017-1022.
 14. Giglio D., Ryberg AT., To K., Delbro DS., Tobin G., 2005. Altered muscarinic receptor subtype expression and functional responses in cyclophosphamide induced cystitis in rats. *Auton Neurosci*, 122, 9-20.
 15. Jamshidzadeh A., Niknahad H., Azarpira N., Mohammadi-Bardbori A., Delnavaz M., 2015. Effect of lycopene on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Iran J Med Sci*, 341, 46-52.
 16. Hollman PC., Katan MB., 1997. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed Pharmacother*, 51, 305-310.
 17. Deng W., Fang X., Wu J., 1997. Flavonoids function as antioxidants: by scavenging reactive oxygen species or by chelating iron?. *Radiat Phys Chem*, 50, 271-276.
 18. Aleksandrov PN., Speranskaia TV., Bobkov lu G., Zagorevskii VA., Zykov DA., 1986. Effect of rutin and esculamine on models of aseptic inflammation. *Farmakol Toksikol*, 49, 84-86.
 19. Deschner EE., Ruperto J., Wong G., Newmark HL., 1991. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12, 1193-1196.
 20. Bear WL., Teel RW., 2000. Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. *Anticancer Res*, 20, 3609-3614.

21. Chen S., Gong J., Liu F., Mohammed U., 2000. Naturally occurring polyphenolic antioxidants modulate IgE-mediated mast cell activation. *Immunology*, 100, 471-480.
22. Pozin VM., Skuratovskaia SG., Pocheptsova GA., 1996. Changes in the vascular Wall and ischemic damages to the myocardium in reversible episodes of heart muscle ischemia. *Fiziologic Zhur*, 42, 10-16.
23. Abarikwu SO., Otuechere CA., Ekor M., Monwuba K., Osobu D., 2012. Rutin ameliorates cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. *Toxicol Int*, 19, 207-214.
24. Nafees S., Rashid S., Ali N., Hasan SK., Sultana S. 2015. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. *Chem Biol Interact*, 231, 98-107.
25. Şengül E., Çelebi F., Gelen V., Çınar A., 2017. The Effects of *Rosmarinus officinalis* (Rosemary) aqueous extract on smooth muscle contractions in isolated rat urinary bladder. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*, 12, 130-136.
26. Tripathi DN., Jena V., 2008. Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells. *Toxicology*, 248, 96-103.
27. Gelen V., Şengül E., Gedikli S., Atila G., Uslu H., Makav M., 2017. The protective effect of rutin and quercetin on 5-FU-induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pac J Trop Biomed*, 7, 647-653.
28. Tong J., Mo QG., Ma BX., Ge LL., Zhou G., Wang YW., 2017. The protective effects of *Cichorium glandulosum* seed and cynarin against cyclophosphamide and its metabolite acrolein-induced hepatotoxicity in vivo and in vitro. *Food Funct*, 8, 209-219.
29. Mok MH., Knight GE., Andrews PL., Hoyle CH., Burnstock G., 2000. The effects of cyclophosphamide on neurotransmission in the urinary bladder of *Suncus murinus*, the house musk shrew. *J Auton Nerv Syst*, 80, 130-136.
30. Andersson MC., Tobin G., Giglio D., 2008. Cholinergic nitric oxide release from the urinary bladder mucosa in cyclophosphamide-induced cystitis of the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol*, 153, 1438-1444.
31. Vizzard MA., Erdman SL., de Groat WC., 1993. Localization of NADPH diaphorase in bladder afferent and postganglionic efferent neurons of the rat. *J Auton Nerv Syst*, 44, 85-90.
32. Masuda H., Ogawa T., Kihara K., Chancellor MB., de Groat WC., Yoshimura N., 2007. Effects of anaesthesia on the nitrenergic pathway during the micturition reflex in rats. *BJU Int*, 100, 175-180.
33. Andersson KE., Arner A., 2004. Urinary bladder contraction and relaxation: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev*, 84, 935-986.
34. Gray KJ., Engelmann UH., Johnson EH., Fishman IJ., 1986. Evaluation of misoprostol cytoprotection of the bladder with cyclophosphamide (cytoxan) therapy. *J Urol*, 133, 497-500.
35. Ribeiro RA., Feritas HC., Campos MC., Santos CC., Figueiredo FC., Brito GA., Cunha FQ., 2002. Tumor necrosis factor-α and interleukin-1β mediate the production of nitric oxide involved in the pathogenesis of ifosfamide induced hemorrhagic cystitis in mice. *J Urol*, 167, 2229-2234.
36. Szabo C., 1996. The pathophysiological role of peroxynitrite in shock, inflammation, and ischemia-reperfusion injury. *Shock*, 6, 79-88.
37. Cuzzocrea S., Reiter RJ., 2001. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 426, 1-10.
38. Korkmaz A., Oter S., Deveci S., Ozgurtas T., Topal T., Sadir S., Bilgic H., 2003. Involvement of nitric oxide and hyperbaric oxygen in the pathogenesis of cyclophosphamide induced hemorrhagic cystitis in rats. *J Urol*, 170, 2498-2502.
39. Souza-Fiho MV., Lima MV., Pompeu MM., Ballejo G., Cunha FQ., Ribeiro Rde A., 1997. Involvement of nitric oxide in the pathogenesis of cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Am J Pathol*, 150, 247-256.

40. Vieira MM., Macedo FY., Filho JN., Costa AC., Cunha AN., Silveira ER., Brito GA., Ribeiro RA., 2004. Ternatin, a flavonoid, prevents cyclophosphamide and ifosfamide-induced hemorrhagic cystitis in rats. *Phytother Res*, 18, 135-141.
41. Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S., 1994. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*, 16, 845-850.
42. Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A., Pifferi G., 1994. A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radic Biol Med*, 16, 547-553.
43. Hozayen WG., 2012. Effect of hesperidin and rutin on doxorubicin induced testicular toxicity in male rats. *Int J Food Nutr Sci*, 1, 31-42.



Bakır Nefrotoksisitesinde Melatonin ve E Vitamini'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri*

Mehmet Ali TEMİZ^{1✉}, Atilla TEMUR²

1. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Karaman, TÜRKİYE.
2. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Bölümü, Van, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
25.12.2017	04.05.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Temiz MA, Temur A: Bakır Nefrotoksisitesinde Melatonin ve E Vitamini'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 347-354, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.370501

Öz: Bakır (Cu) bileşikler özellikle endüstri ve tarımda geniş kullanım alanına sahiptir. İz miktardaki Cu hayatın sürdürülebilir olması için gerekli fakat fazla organizma için toksik etki yapmaktadır. Bu çalışma akut Cu toksisitesinde melatonin ve E vitamini'nin böbreklerdeki antioksidan enzim aktivitelerine etkisinin araştırılması amacıyla planlanmıştır. Çalışmada 28 *Wistar albino* sıçanlar kontrol grubu, Cu grubu, Cu+E vitamini grubu ve Cu+Melatonin grubu şeklinde eşit dört gruba (n=7) ayrıldı. Böbrek dokusunda süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT) enzim aktiviteleri ve protein karbonil içeriği analiz edildi. Ayrıca böbrek fonksiyon testleri değerlendirildi. Bakır uygulaması, kreatinin, kan üre nitrojeni (BUN), ürik asit, Na, K ve Mg değerlerini artırırken, E vitamini ve melatonin bu değerlerin azalmasında etkili oldu. Karbonil seviyesi, Cu+E vitamini veya Cu+melatonin gruplarında Cu grubuna göre önemli derecede azaldı. Doku SOD, GPx ve KAT aktiviteleri Cu maruziyeti sonucu düşmesine rağmen; E vitamini veya melatonin uygulaması, bu aktivitelerde önemli bir artışa neden oldu. Sonuç olarak, E vitamini ve melatonin takviyesi antioksidan sistemi güçlendirerek Cu temelli oksidasyonun engellenmesini sağlayabilir. Bu sayede nefrotoksisitenin gelişmesini önleyerek koruyucu bir fonksiyon gösterebilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, E vitamini, Melatonin, Oksidatif stres, Protein oksidasyonu.

The Effects of Melatonin and Vitamin E on Antioxidant Parameters in Copper Nephrotoxicity

Abstract: Copper (Cu) compounds have been widely used in various fields especially industrial processes and agriculture. Although trace amounts of Cu are essential to sustain life, excessive Cu is toxic for living organisms. This study aims to investigate the effects of vitamin E and melatonin on antioxidant enzymes activities in kidney against acute Cu toxicity. In this study, 28 *Wistar albino* rats were divided four equal groups (n=7) as control, Cu, Cu+Vitamin E, and Cu+Melatonin groups. Superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) enzymes activities and protein carbonyl content were analyzed. Also, kidney function tests were evaluated. While Cu administration increased creatinine, blood urea nitrogen (BUN), uric acid, Na, K and Mg levels, vitamin E and melatonin was effective reduction on these levels. Carbonyl level significantly decreased in Cu+Vitamin E and Cu+melatonin groups compared to Cu group. Although SOD, GPx and CAT activities in tissue decreased by Cu exposure, vitamin E and melatonin treatment showed significant increase on their activities. Consequently, vitamin E and melatonin supplements may provide prevention Cu -based oxidation by strengthening the antioxidant defense system. In this respect, it may show a protective effect by preventing the development of nephrotoxicity.

Keywords: Antioxidant, Melatonin, Oxidative stress, Protein oxidation, Vitamin E.

✉ Mehmet Ali TEMİZ

Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Programı, Karaman, TÜRKİYE.
e-posta: mehmetali.temiz@gmail.com, matemiz@kmu.edu.tr

*Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (2013-EF-B025).

GİRİŞ

Bakır (Cu), vücutta bazı enzimlerin yapısına girip redoks tepkimelerinde elektron transferinde görev yapar. Özellikle pek çok oksidaz ve oksijenaz enzimlerinde kofaktör olarak kullanılmaktadır. Bakırın tavsiye edilen günlük alım miktarı (RDA) erkek ve kadın için 900 µg/gün olarak belirlenmiştir. Kritik karaciğer hasarından korunabilme temeline dayalı olarak belirlenen Cu miktarı yetişkinler için tolere edilebilir en üst alım seviyesi 10.000 µg/gün (10 mg/gün)'dür (1). Aşırı Cu alımı karaciğer (sakatat), deniz ürünleri, kabuklu yemişler, tam tahıllar ve kurutulmuş meyvelerin tüketilmesi yoluyla olabilir. Bakır maruziyeti ayrıca tarımda yaygın bir şekilde kullanılan Cu bazlı pestisitler sonucu besinlerdeki kalıntıdan dolayı da olabilir (2,3). Aynı zamanda çevresel kirlenmeden dolayı içme sularının kontamine olması (2,4), Cu kullanılan eski şebeke borularının korozyona uğramasıyla da (5) maruziyet oluşabilmektedir. Diğer taraftan Wilson hastalığı, Hindistan tipi çocukluk çağı sirozu (Indian childhood cirrhosis) ve idiyopatik Cu toksikasyonu gibi genetik defektlerden dolayı da Cu'ın organlarda birikmesi muhtemeldir (6). Böbrek ve karaciğer insanda detoksifikasyon olaylarında önde gelen organlardır. Bu yüzden toksik maddelerden en çok etkilenen dokulardır. Bakır, Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucunda hidroksil (OH*) radikalinin oluşumuyla sonuçlanan bazı reaksiyonlara katılabilir ve çeşitli patolojik sonuçların gelişmesine öncülük edebilir (7). Bununla birlikte reaktif oksijen türleri (ROT) tarafından organizmada oluşan oksidatif stres, antioksidanlar tarafından baskılanmaya çalışılmaktadır.

Besin takviyesi olarak melatonin, E vitamini ve kurkumin gibi takviyelerin sağlığını iyileştirilmesi ya da hastalıklardan korunma amacıyla proflaktik kullanımları günümüzde giderek yaygınlaşmaya başlamıştır (8,9). Takviye besinlerin kullanımı bağışıklık sisteminin geliştirilmesi, bazı kanser ve

hastalıkların azaltılması bakımından yararlı olabilir (9-11). Melatonin pineal bezde üretilerek salınır ve gece en üst seviyeye ulaşır. Melatonin sirkadyen ritim, kan basıncının düzenlenmesi, onkojeniz, kronobiyotik fonksiyon, retinal fizyoloji, bağışıklık fonksiyonu, apoptoz ve mitokondrial homeostaz gibi pek çok fizyolojik sürece dâhil olur (12). E vitamini en etkili ve güçlü formu olan α-tokoferol membran bütünlüğünün sürdürülmesi, hücre sinyali ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, hücre adezyonu, trombosit agregasyonu, düz kas hücre proliferasyonu ve bağışıklık fonksiyonu gibi pek çok fizyolojik fonksiyona dâhil olur (9). Zincir kırıcı ve serbest radikal temizleyicisi olarak biyolojik membranlarda oksidatif strese karşı özellikle lipid peroksidasyonuna karşı non-enzimatik koruma sağlar (9). Çalışmanın amacı sıçanlarda bakır-indüklü böbrek hasarında melatonin ve E vitamini takviyesinin antioksidan parametrelere etkisini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Hayvanlar ve Deneysel Protokol

Çalışmanın materyalini, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanları Ünitesinden temin edilen, 200-300 gr ağırlığında, 3-4 aylık 28 adet *Wistar albino* erkek sıçanlar oluşturmaktadır. Hayvanlar *ad libitum* standart yem ve musluk suyu ile beslendi. Sudaki Cu miktarı atomik absorpsiyon spektrofometre cihazı (Thermo Scientific İCE-3000 series) ile 0.0044 mg/L olarak tespit edildi. Yemdeki Cu ve E vitamini (α-tokoferol) ise yem tedarikçisinin (Bayramoğlu yem ve un sanayi A.Ş., Erzurum) yem içeriğinde belirtmiş olduğu üzere sırasıyla 33.51 mg/kg ve 67.54 mg/kg'dır. Ratlar sıcaklığı 22±2°C, nemi %50 olan ortamda 12 saat gece/gündüz tutuldular. Çalışmada biri kontrol olmak üzere toplam 4 eşit grup (n=7) oluşturuldu. Kontrol grubuna 14 gün boyunca sadece serum fizyolojik i.p verildi. Bakır uygulanan tüm gruplara (Cu, Cu+E vitamini ve Cu+Melatonin) 10 mg/kg vücut ağırlığı

(bw) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i.p (13) gün aşırı verildi. CU+Vitamin E grubuna (Cu+Vit E) ayrıca her gün 40 mg/kg bw i.m α -tokoferol (E vitamini eşdeğeri olarak) (14) uygulandı. Cu+Melatonin grubuna da (Cu+Mel) ayrıca her gün 25 mg/kg bw i.p melatonin (15) uygulandı. Deneme 14 gün devam ettirildi. Bu çalışma, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir (no. 03-27552122-105).

Örneklerin Toplanması

Deney sonrası sıçanlar ketamin+ksilazin ile anestezi altına alındı. Böbrek fonksiyon testleri için gereken kan, sıçanların kalbinden alınarak EDTA'lı tüplere aktarıldı. Daha sonra tüplerdeki kan 3000 rpm'de, 10 dakika santrifüj edildi ve Roche Modular PP otoanalizörde analizleri yapıldı. Ayrıca, sıçanların böbrek dokuları alındıktan sonra fizyolojik suyla yıkanıp kurutuldu ve analizleri yapılana kadar derin dondurucuda (Haier ULT frezer) (-80°C) muhafaza edildi. Daha sonra böbrek dokusu soğuk fosfat tuz tamponunda (pH 7.4) homojenize edilerek (Bandelin Sonopuls HD 2200) 9500 rpm 30 dk +4°C'de santrifüj (Hettich Universal 320 R) edildi. Elde edilen süpernatantlar antioksidan enzim aktiviteleri ve protein karbonil analizi için hazır hale getirildi.

Biyokimyasal Analizler

Bakır-indüklü oksidatif stres derecesi protein oksidasyonunun ölçülmesiyle değerlendirildi. Protein oksidasyonu (protein karbonil) Cayman's Protein Carbonyl Assay Kit (Cat. no 10005020) ile örneklerde karbonil bileşik olarak ölçüldü. Protein oksidasyon göstergesi, karbonil grubunun 2,4-dinitrofenil hidrazin ile reaksiyona girerek 2,4-dinitrofenilhidrazon oluşturması prensibine dayanmaktadır (16). Böbrek süperoksit dizmutaz (SOD) aktivitesi, formazondye oluşumunun inhibisyon yüzdesi hesaplanarak 505 nm dalga boyunda ölçüldü (17). Glutatyon peroksidaz (GPx) aktivitesi, kümen hidroperoksit tarafından redükte glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizlemesine

dayanarak belirlendi (18). Katalaz (KAT) aktivitesi Aebi'nin (19) metoduna göre tespit edildi. Katalaz aktivitesi 240 nm'de H_2O_2 'nin parçalanarak su ve oksijene dönüşümü ile ölçüldü. Protein miktar tayini Lowry yöntemi modifiye edilerek yapıldı. Antioksidan enzim aktiviteleri EU/mg protein olarak spesifik aktiviteleri ve protein karbonil miktarı nmol/mg protein olarak ifade edildi. Biyokimyasal analizler Boeco S-22 UV-VIS spektrofotometre cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen bulgular aritmetik ortalama (\bar{X}) ve standart sapma (\pm SD) olarak ifade edildi. Gruplar arasındaki fark ANOVA testi ve ikili gruplar TUKEY HSD testi kullanılarak yapıldı. Anlamlılık sınırı $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

BULGULAR

Böbrek fonksiyon testleri akut böbrek hasarı göstergesi olarak kullanılır. Bakır maruziyeti gösterdi ki kreatinin, BUN (kan üre nitrojeni) ve ürik asit değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yükseldi (Tablo 1). Diğer taraftan E vitamini ve melatonin uygulaması bu değerlerin kontrol grubu seviyelerine gerilemesine yardımcı oldu ($P < 0.05$). Ayrıca serum Na^+ , K^+ , Mg^{+2} seviyeleri Cu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ($P < 0.05$) yükselirken; bu değerlerin hepsi Cu+Vit E ve Cu+Mel gruplarında istatistiksel olarak azalma gösterdi ($P < 0.05$) (Tablo 2). Çalışmadan elde edilen bulgulara göre protein oksidasyon göstergesi olarak böbrek karbonil seviyesi Cu grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak yükseldi (Şekil 1A). Ancak Cu uygulamasının yanında E vitamini veya melatonin kombinasyonu karbonil düzeyini önemli derecede azalttı ($P < 0.05$). Antioksidan enzim aktivitelerinden SOD, GPx ve KAT aktiviteleri Cu maruziyeti sonucu düşmesine rağmen; E vitamini veya melatonin muamelesi bu enzim aktivitelerinde önemli bir artışa neden oldu ($P < 0.05$; Şekil 1B, 1C ve 1D).

Tablo 1. Böbrek fonksiyon test değerleri.**Table 1.** Kidney function test values.

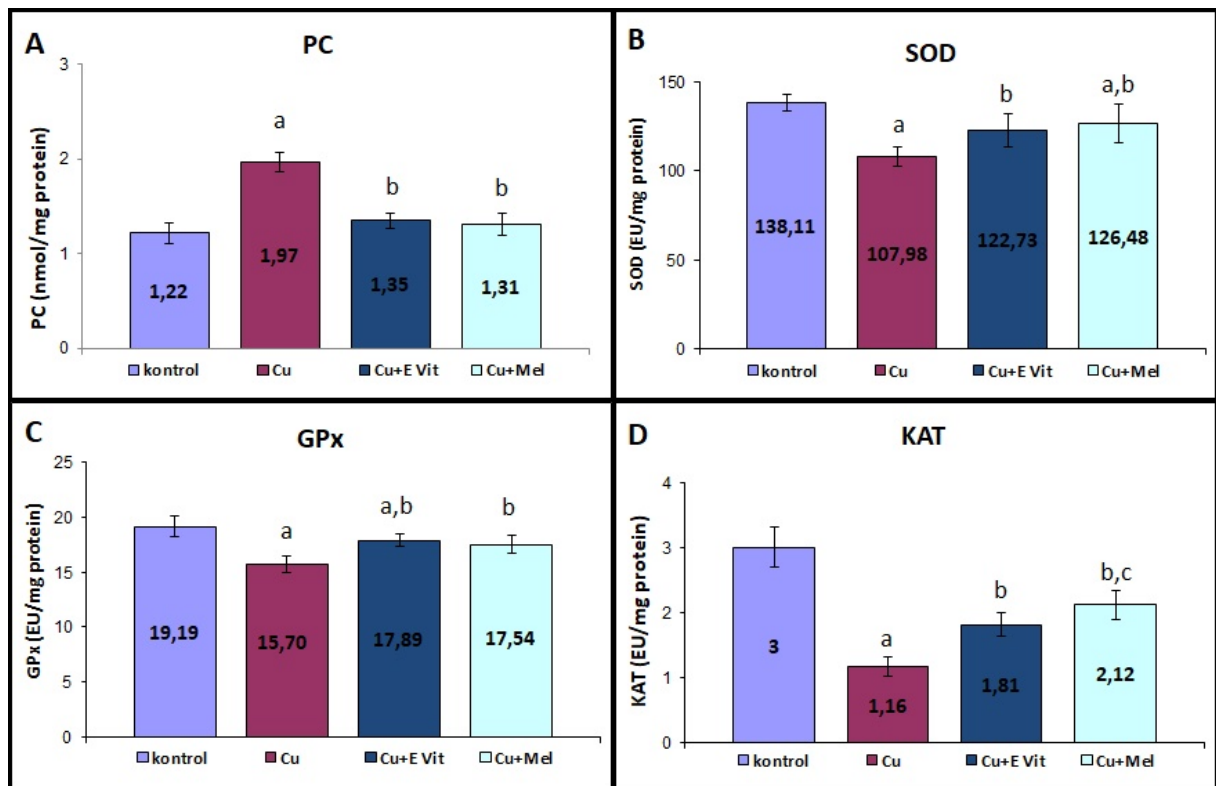
Böbrek Fonksiyon Testleri				
SERUM	Kontrol	Cu	Cu+Vit E	Cu+Mel
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Kreatinin (mg/dL)	0,22±0,05	0,64±0,10 ^a	0,50±0,10 ^{a,b}	0,48±0,05 ^{a,b}
BUN (mg/dL)	22,7±2,5	35,7±4,8 ^a	27,0±4,5 ^b	27,3±1,8 ^b
Ürik asit (mg/dL)	1,34±0,07	3,70±0,42 ^a	1,74±0,25 ^b	1,70±0,58 ^b

Cu: Bakır grubu, Cu+Vit E: Bakır + E vitamini grubu, Cu+Mel: Bakır + Melatonin grubu, BUN: Kan Üre Nitrojeni, a: Kontrol grubundan istatistiksel açıdan farklı (P<0.05), b: Cu grubundan istatistiksel açıdan farklı (P<0.05).

Tablo 2.Ratların serum elektrolit parametreleri.**Table 2.** Serum electrolyte parameters of rats.

Elektrolit	Kontrol	Cu	Cu+Vit E	Cu+Mel
	X ± SD	X ± SD	X ± SD	X ± SD
Na (mmol/L)	138,2±2,0	148,5±5,2 ^a	141,7±3,8 ^b	140,3±3,2 ^b
K (mmol/L)	5,1±0,9	6,3±0,3 ^a	4,8±0,2 ^b	4,9±0,6 ^b
Cl (mmol/L)	98,2±1,9	98,0±1,9	98,5±6,9	98,2±6,9
Ca (mg/dL)	9,9±0,5	9,5±0,7	9,6±0,3	9,4±0,5
Mg (mg/dL)	2,3±0,4	3,8±0,8 ^a	2,6±0,4 ^b	2,8±0,3 ^b
P (mg/dL)	8,2±1,3	9,7±1,1	6,5±0,9 ^{a,b}	6,8±1,0 ^b

Cu: Bakır grubu, Cu+Vit E: Bakır + E vitamini grubu, Cu+Mel: Bakır + Melatonin grubu, a: Kontrol grubundan istatistiksel açıdan farklı (p<0,05), b: Cu grubundan istatistiksel açıdan farklı (p<0,05).



Cu: Bakır grubu, Cu+Vit E: Bakır + E vitamini grubu, Cu+Mel: Bakır + Melatonin grubu, PC: Protein Karbonil; SOD: Süperoksit dismutaz; GPx: Glutasyon peroksidaz; KAT: Katalaz, a: Kontrol grubundan istatistiksel açıdan farklı (P<0.05), b: Cu grubundan istatistiksel açıdan farklı (P<0.05), c: Cu+VitE grubundan istatistiksel açıdan farklı (P<0.05).

Şekil 1. Deney gruplarının Protein karbonil seviyeleri (A) ile SOD (B), GPx (C) ve KAT (D) enzim aktiviteleri.**Figure 1.** Protein carbonyl levels (A), and SOD (B), GPx (C) and CAT (D) enzymes activities of experimental groups.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Mevcut çalışmada Cu'nun toksik etkileri, serumda artan böbrek fonksiyon değerleri, böbrek dokusunda yüksek karbonile protein içeriği ve antioksidan enzim aktivitelerindeki değişim ile gösterilmiştir. Böbrek fonksiyonunun bozulması sonucu metabolik yıkım ürünlerinin ve yabancı kimyasal maddelerin atım kapasitesi (üre, kreatinin, ürik asit, ilaçlar, katkı maddeleri) ve vücut sıvı elektrolit (Na^+ , K^+ , H^+ , HCO_3^- (bikarbonat), Ca^{+2} , P , Mg^{+2}) dengesinin sağlanmasını etkilediği bilinmektedir (20,21). Sunulan çalışmada Cu uygulaması sonucu kontrol grubuna göre BUN, kreatinin ve ürik asit seviyelerinin yükseldiği ve elektrolit dengesinin bozulduğu gözlenmiştir. Bakırın renal atılımı 24 saatlik periyotta 10-20 μg civarındadır. Artmış Cu, böbrek glomerüllerinden süzülme ve proksimal tübüllerden emilmektedir. Bu yüzden fazla Cu, doğrudan tübüler hücrelere zarar verebilir (22). Ayrıca nano Cu uygulamasının böbrek proksimal tübüllerde yaygın şekilde nekroza neden olduğunu bildirilmiştir (23). Yapılan çalışmada elektrolitlerin azalmış atılımının Cu-nefrotoksisine bağlı olarak gelişen glomerüler ve tübüler disfonksiyondan dolayı olduğu düşünülmektedir. Diğer taraftan mevcut çalışmada metabolik yıkım ürünlerindeki (kreatinin, üre ve ürik asit) yükselme Arnal ve ark. (24)'nın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Arnal ve ark. (24) Cu içerikli pestisit kullanan tarım işçilerinin aynı bölgede yaşayan ancak pestisit kullanmamış kişilere göre üre ve kreatinin seviyelerinin daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Sıçanlara 5 gün boyunca 200 mg/kg oral nano Cu uygulamasının BUN seviyesini 5 kattan daha fazla ve kreatinin seviyesini ise 10 kattan daha fazla (23); 100 ve 200 mg/kg oral bakırın 60 ve 90 gün kronik uygulamasının ise BUN seviyesini anlamlı olarak yükselttiği (25) belirtilmiştir. Benzer olarak subakut düşük doz cıvanın ve kurşunun (26) ve ayrıca kadmiyumun (27) ürik asit, üre ve kreatinin seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Diğer taraftan mevcut çalışmada Cu ile birlikte E vitamini veya melatonin takviyesi kreatinin ve BUN seviyelerini istatistiki olarak düşürmüştür. Elde edilen bulguların daha önce

yapılan çalışmalar ile uyumlu olarak 0.1 mg/kg içme suyuna karıştırılan Cu'nun üre ve kreatinin seviyelerini arttırdığı bununla birlikte 20 mg/kg E vitamini tedavisiyle (28) ve cıva maruziyeti ile birlikte 100 mg/kg E vitamininin ürik asit, üre ve kreatinin seviyelerini azalttığı (29) ifade edilmiştir. Sıçan böbrek dokusunda kadmiyum-indüklü toksisitede E vitamini takviyesinin BUN ve kreatinin seviyelerini düşürmede etkili olduğu ve E vitamininin potansiyel bir karaciğer ve böbrek koruyucu olabileceği vurgulanmıştır (30).

Bakır, Haber-Weiss reaksiyonu esnasında oluşan reaktif hidroksil radikali (OH^*) aracılığıyla protein gibi makromoleküllerin oksidasyonuna öncülük edebilir. Hücre içi ve hücre dışı multikatalitik proteinazlar sıklıkla oksidasyondan dolayı degrade olurlar. Bu nedenle, proteinlerin inaktif hale gelmesi çeşitli oksidatif ve patolojik sonuçlara sebep olur (31). Mevcut çalışmada böbrekte proteinlerin oksidasyon göstergesi olarak kullanılan karbonil içeriği bakır grubunda önemli derecede artmıştır. Ancak E vitamini ve melatonin tedavi gruplarında ise karbonil içeriği bakır grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı görülmektedir. Daha önce 7 veya 35 ppm CuCO_3 'ün 30 gün boyunca hem oral hem de i.p uygulamasının sıçan beyin dokusunda protein oksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir (32). Diğer taraftan E vitamini (6) ve melatoninin (33) bakırın neden olduğu lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Literatürde lipid peroksidasyon üzerine çalışma mevcutken (33,34) sıçan böbrek dokusu protein oksidasyonuna etkisi üzerine yapılan çalışma mevcut değildir.

Böbrek SOD, GPX ve KAT aktiviteleri bakır maruziyeti sonucu azalırken, E vitamini ve melatonin takviyesiyle bu enzim aktiviteleri artış göstermiştir. Oksidan/antioksidan dengenin sağlanması normal yaşam döngüsünde oldukça hassastır. Ancak, bakır kaynaklı Haber-Weiss ve Fenton reaksiyonları sonucu aşırı artan ROT'ların elimine edilememesiyle antioksidan aktivitelerinde bir azalma görülebilir. Bu antioksidan enzim aktivitelerinin azalmasının nedeni (I) enzimin tüketilmesinden, ya da (II) enzimlerinde

bir protein yapısına sahip olduğu düşünüldüğünde protein oksidasyonundan dolayı enzimin oksidatif modifikasyona uğramalarından veya (III) inaktif hale gelmelerinden kaynaklanmış olabilir (35,36). Ek olarak Speisky ve çalışma arkadaşlarının (37) belirttiği üzere bakırın yüksek seviyelerine maruz kalmak hücrede glutatyon seviyesinin önemli olarak azalmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı glutatyonu ko-substrat olarak kullanan GPx aktivitesinin bakır grubunda azaldığı düşünülmektedir. Daha önce Ajith ve çalışma arkadaşları (38) sisplatin-indüklü böbrek hasarında yüksek doz E vitamini (500 mg/kg) uygulamasıyla SOD, GPx ve KAT aktivitelerinin arttığını ve bu sonucun E vitaminin elektrofilik serbest radikal temizleme özelliğinden dolayı olabileceğini ifade etmişlerdir (38). Çalışmamızda elde edilen bulgular Ossola ve ark. (39)'nın bakır uygulaması sonucu sıçan karaciğerinde azalan GPx ve KAT aktivitesi, E vitamini ve melatonin tedavisiyle birlikte önemli bir artış olduğu bulgusuyla benzerlik göstermektedir. Başka bir çalışma (40) ise kurşun ile birlikte melatonin tedavisi böbrek SOD aktivitesinin iyileştirilmesine katkı sağlamıştır. Ayrıca melatoninin, kurşunun neden olduğu böbreklerdeki morfolojik hasarların oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. E vitamininin kromanol halkasının oksidasyonu zincir kırıcı antioksidan fonksiyonun temelini oluşturur. E vitamini, membranlarda çoklu doymamış yağ asit türleri üzerindeki atakları önlemek için bir yağ açıl serbest radikale (ya da $O_2^{\cdot-}$) fenolik hidrojenin verilmesi ile zincir kırıcı etkiyi gerçekleştirir (9). Bu varsayım temelinde E vitamininin oksidatif stresi kontrol ederek antioksidan enzimleri asiste ettiği düşünülmektedir. Diğer taraftan melatoninin ise response elementler vasıtasıyla gen ekspresyonunu, mRNA'nın yarılanma ömür stabilitesini veya bazı enzimlerin aktivitelerini (SOD, GPx, GR, glukoz-6-fosfat dehidrojenaz ve γ -glutamilsistein sentetaz) attırarak oksidatif stresi baskılamış olabilir (41,42). E vitamini muhtemelen bu etkileri mikrozomal membranları oksijen-metal kompleksi gibi peroksidasyon bileşiklerine karşı koruyarak ve zincir

kırıcı antioksidan aktivitesi sayesinde ortaya koymaktadır (43). Bununla birlikte melatonin de bu etkileri (I) serbest radikalleri detoksifiye ederek "direkt antioksidan etkisiyle" (44), (II) bazı antioksidan enzim aktivitelerinin gen ekspresyonunu/aktivitesini arttırarak "antioksidan enzim-aracılı etkisiyle" (45) ya da prooksidan enzim aktivitelerini inhibe edip serbest radikallerin oluşumunu azaltarak "prooksidan enzim-aracılı etkisiyle" (44) ortaya koyduğu düşünülmektedir.

Sonuç olarak, E vitamini ve melatoninin protein oksidasyonunu azaltarak ve antioksidan savunma sistemini güçlendirerek bakır-indüklü nefrotoksisitenin engellenmesine yardımcı olduğu açık bir şekilde gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Dietary Reference Intakes., 2001. Dietary Reference Intakes. Institute of Medicine (US) Panel on Micronutrients. Washington (DC): National Academies Press (US). Chapter 7- Copper, 224-257.
2. WHO, 2003. Copper in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. Geneva, World Health Organization (WHO/SDE/WSH/03.04/88).
3. Regueiro J., Lopez-Fernandez O., Rial-Otero R., Cancho-Grande B., Simal-Gandara J., 2015. A review on the fermentation of foods and the residues of pesticides—Biotransformation of pesticides and effects on fermentation and food quality. Crit Rev Food Sci Nutr, 55, 839-863.
4. Harvey PJ., Handley HK., Taylor MP., 2016. Widespread copper and lead contamination of household drinking water, New South Wales, Australia. Environ Res, 151, 275-285.
5. Brewer GJ., 2012. Metals in the causation and treatment of Wilson's disease and Alzheimer's disease, and copper lowering therapy in medicine. Inorg Chim Acta, 393, 135-141.
6. Gaetke LM., Chow CK., 2003. Copper toxicity,

- oxidative stress, and antioxidant nutrients. *Toxicology*, 189, 147-163.
7. Kanti Das TK., Wati MR., Fatima-Shad K., 2015. Oxidative stress gated by Fenton and Haber Weiss reactions and its association with Alzheimer's disease. *Arch Neurosci*, 2, e60038.
 8. Pham-Huy LA., He H., Pham-Huy C., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci*, 4, 89-96.
 9. Combs GF., McClung JP., 2017. *The Vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. 5th ed., 182-508, Academic Press, California.
 10. Carrillo-Vico A., Lardone PJ., Alvarez-Sanchez N., Rodriguez-Rodriguez A., Guerrero JM., 2013. Melatonin: Buffering the Immune System. *Int J Mol Sci*, 14, 8638-8683.
 11. Cutando A., Lopez-Valverde A., Arias-Santiago S., de Vicente J., de Diego RG., 2012. Role of melatonin in cancer treatment. *Anticancer Res*, 32, 2747-2753.
 12. Hardeland R., Cardinali DP., Srinivasan V., Spence DW., Brown GM., Pandi-Perumal SR., 2011. Melatonin a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 93, 350-384.
 13. Saleha-Banu B., Ishaq M., Danadevi K., Padmavathi P., Ahuja YR., 2004. DNA damage in leukocytes of mice treated with copper sulfate. *Food Chem Toxicol*, 42, 1931-1936.
 14. Giray B., Gürbay A., Hincal F., 2001. Cypermethrin-induced oxidative stress in rat brain and liver is prevented by Vitamin E or allopurinol. *Toxicol Lett*, 118, 139-146.
 15. Zararsiz I., Sarsilmaz M., Tas U., Kus I., Meydan S., Ozan E., 2007. Protective effect of melatonin against formaldehyde-induced kidney damage in rats. *Toxicol Ind Health*, 23, 573-579.
 16. Levine RL., Garland D., Oliver CN., Amici A., Climent I., Lenz AG., Ahn BW., Shaltiel S., Stadtman ER., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol*, 186, 464-478.
 17. McCord JM., Fridovich I., 1969. Superoxide dismutase. an enzymic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J Biol Chem*, 244, 6049-6055.
 18. Paglia DE., Valentine WN., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 70, 158-169.
 19. Aebi H., 1984. Catalase in vitro. *Method Enzymol*, 105, 121-126.
 20. Langston C., 2017. Managing fluid and electrolyte disorders in kidney disease. *Vet Clin Small Anim*, 47, 471-490.
 21. Lin J., Cheng Z., Ding X., Qian Q., 2018. Acid-base and electrolyte managements in chronic kidney disease and end-stage renal disease: Case-based discussion. *Blood Purif*, 45, 179-186.
 22. Lifton RP., Somlo S., Giebisch GH., Seldin DW., 2009. *Genetic Diseases of the Kidney*. 1st ed., 710-711, Academic Press, New York.
 23. Lei R., Wu C., Yang B., Ma H., Shi C., Wang Q., Wang Q., Yuan Y., Liao M., 2008. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. A rapid in vivo screening method for nanotoxicity. *Toxicol App Pharmacol*, 232, 292-301.
 24. Arnal N., Astiz M., Alaniz de MJT., Marra CA., 2011. Clinical parameters and biomarkers of oxidative stress in agricultural workers who applied copper-based pesticides. *Ecotoxicol Environ Saf*, 74, 1779-1786.
 25. Kumar V., Kalita J., Misra UK., Bora HK., 2015. A study of dose response and organ susceptibility of copper toxicity in a rat model. *J Trace Elem Med Biol*, 29, 269-274.
 26. Apaydin FG., Bas H., Kalender S., Kalender Y., 2016. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 41, 219-224.
 27. Ansari MA., Raishb M., Ahmad A., Alkharfy KM., Ahmad SF., Attia SM., Alsaad AMS., Bakheet SA., 2017. Sinapic acid ameliorate cadmium-induced nephrotoxicity: In vivo possible involvement of oxidative stress, apoptosis, and inflammation via

- NF- κ B downregulation. *Environ Toxicol Pharmacol*, 51, 100-107.
28. Osfor MMH., Ibrahim HS., Mohamed YA., Ahmed AM., Abd El Azeem AS., Hegazy AM., 2010. Effect of alpha lipoic acid and vitamin E on heavy metals intoxication in male albino rats. *J Am Sci*, 6, 56-63.
29. Aslanturk A., Uzunhisarcikli U., Kalender S., Demir F., 2014. Sodium selenite and vitamin E in preventing mercuric chloride induced renal toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*, 70, 185-190.
30. Ahmadizadeh M., Baghpa AR., 2008. The preventive effect of vitamin E on cadmium chloride-induced toxicity in rat liver and kidney. *Jundishapur Sci Med J*, 6, 404-413.
31. Stadtman ER., 2006. Protein oxidation and aging. *Free Rad Res* 40, 1250-1258.
32. Arnal N., Dominici L., de Tacconi MTJ., Marra CA., 2014. Copper-induced alterations in rat brain depends on route of overload and basal copper levels. *Nutrition*, 30, 96-106.
33. Parmar P., Limson J., Nyokong T., Daya S., 2002. Melatonin protects against copper-mediated free radical damage. *J Pineal Res*, 32, 237-242.
34. Zhang SSZ., Noordin MM., Rahman SOA., Haron MJ., 2000. Effects of copper overload on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defense in rats. *Vet Hum Toxicol*, 42, 261-264.
35. Dalle-Donne I., Rossi R., Giustarini D., Milzani A., Colombo R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta*, 329, 23-38.
36. Nyström T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J*, 24, 1311-1317.
37. Speisky H., Gomez M., Burgos-Bravo F., Lopez-Alarcon C., Jullian C., Olea-Azar C., Aliaga ME., 2009. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorg Med Chem*, 17, 1803-1810.
38. Ajith TA., Usha S., Nivitha V., 2007. Ascorbic acid and α -tocopherol protect anticancer drug cisplatin induced nephrotoxicity in mice: a comparative study. *Clin Chim Acta*, 375, 82-86.
39. Ossola JO., Groppa MD., Tomaro ML., 1997. Relationship between oxidative stress and heme oxygenase induction by copper sulfate. *Arch Biochem Biophys*, 337, 332-337.
40. El-Sokkary GH., Abdel-Rahman GH., Kamel ES., 2005. Melatonin protects against lead-induced hepatic and renal toxicity in male rats. *Toxicology*, 213, 25-33.
41. Mayo JC., Sainz RM., Antolin I., Herrera F., Martin V., Rodriguez C., 2002. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cell Mol Life Sci*, 59, 1706-1713.
42. Reiter RJ., Tan DX., Osuna C., Gitto E., 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J Biomed Sci*, 7, 444-458.
43. Sajitha GR., Jose R., Andrews A., Ajantha KG., Augustine P., Augusti KT., 2010. Garlic oil and vitamin e prevent the adverse effects of lead acetate and ethanol separately as well as in combination in the drinking water of rats. *Indian J Clin Biochem*, 25, 280-288.
44. Zhang H., Zhang Y., 2014. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Pineal Res*, 57, 131-146.
45. Emamgholipour S., Hossein-Nezhad A., Ansari M., 2016. Can melatonin act as an antioxidant in hydrogen peroxide-induced oxidative stress model in human peripheral blood mononuclear cells? *Biochem Res Int*, 2016, 1-8.



Kars İlindeki Süt İneklerinin Kış Dönemindeki Besleme İlkeleri

Cavit ARSLAN¹, Tuncay TUFAN²✉

1. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.
2. Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Siirt, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
28.03.2018	14.08.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Arslan C, Tufan T: Kars ilindeki Süt İneklerinin Kış Dönemindeki Besleme İlkeleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 355-363, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.410568

Öz: Bu araştırma, Kars ilindeki süt ineklerinin kış dönemindeki besleme ilkelerini belirlemek amacıyla anket çalışması şeklinde yapıldı. Bu amaçla, Kars il merkezi ve ilçelerinde süt sığırcı işletmecileri ile yüz yüze anketler yapıldı. Yapılan anketlerin 10 tanesi Kars il merkezindeki süt ineği işletmecisi ile geri kalanları ise Kars'ın Susuz, Arpaçay, Akyaka, Selim, Sarıkamış, Kağızman ve Digor ilçelerinde (her bir ilçede 5 adet) olmak üzere toplam 45 adet süt ineği işletmecisiyle yüz yüze gerçekleştirildi. Bu çalışma sonucunda; Kars ilinde kış aylarında yapılan süt ineği besisinde en fazla kullanılan kaba yemlerin saman, çayır kuru otu ve korunga, konsantre yemlerin ise arpa kırması ve sığır süt yemi olduğu belirlendi. İşletmelerin tamamının konsantre yem verdiği, kaba ve konsantre yemlerin karıştırılarak verildiği tespit edildi. Süt ineklerinin %44 oranında 2 öğün, %48 oranında 3 öğünde beslendiği, %78 oranında ise 2 öğün halinde sulandığı belirlendi. İşletmelerin tümünde tuz kullanıldığı, fakat vitamin-mineral yalama bloğu kullanılmadığı tespit edildi. Süt ineği işletmelerinin hayvanlarını beslerken teknik personelden destek almadığı belirlendi. Kış mevsimi beslemelerinde indigesyon, ishal ve timpani gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarının nadiren görülme sıklığının %50, pikanın nadiren görülme sıklığının %70 olduğu tespit edildi. Besleme ile ilgili en önemli problemin yemlerin pahalı olması olduğu belirlendi. Sonuç olarak; Kars ilindeki süt ineği işletmelerinin geleneksel yöntemle besleme yöntemlerine bağlı olarak süt ineklerini besledikleri, besleme konusunda ciddi problemlerle karşılaşmadıkları, fakat özellikle vitamin-mineral yetersizliklerinin olabileceği, yetiştiricilerin küçük yönlendirme tavsiyeleriyle hayvanlarını daha yeterli ve dengeli bir şekilde besleyebilecekleri kanaatine ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Besleme ilkeleri, Kars, Kış beslemesi, Süt ineği.

Winter Feeding Principles of Dairy Cows in Kars Province

Abstract: This research was conducted as a survey study to determine the winter feeding principles of dairy cows in Kars province. For this purpose, face to face survey conducted with dairy cow managers in the city center and the districts of Kars. 10 of the surveys were carried out with the dairy cow managers in Kars province center and the rest were carried out with 45 dairy cow managers in Susuz, Arpaçay, Akyaka, Selim, Sarıkamış, Kağızman and Digor (five in each district) that are districts of Kars. As a result of this study; it was determined that most common used bulky feeds were straw, dried grass and dried sainfoin, and also the most common used concentrate feeds were barley crumbs and cattle milk feed in the dairy farm in Kars province in the winter season. It was found that all of the managers were provided with concentrated feed their cattle, and they offered roughage and concentrated feeds by mixed form. The 44% of the dairy cows were fed 2 times and 48% three times a day, and 78% of which watering at 2 times a day. It was found that all the managers were using salt, but no vitamin-mineral licking block. It was determined that dairy farming managers did not receive support from the technical staff while feeding their animals. The incidence of rare digestive system disorders such as indigestion, diarrhea and tympani was 50% and the incidence of pica was rarely 70% in winter seasons. It was determined that the most important problem with feeding was that the feeds were expensive. As a result; it has been found that dairy farmers in Kars province is fed dairy cows according to their traditional feeding methods, and do not have serious problems with feeding their animals, but it can be expected that especially vitamin and mineral deficiencies and that managers can feed their animals more adequately and balancedly with small guidance.

Keywords: Dairy cow, Feeding principles, Kars, Winter feeding.

✉ Tuncay TUFAN

Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, Siirt, TÜRKİYE.
e-posta: tuncay-tufan@hotmail.com

GİRİŞ

Kars ili Türkiye'nin kuzey-doğusunda, ortalama irtifası 2000 m civarındaki plato sahasında yerleşik bulunan, kışları uzun ve soğuk, yazları kısa serin ve yağışlı, sert karasal iklimin etkisinde olan bir ilimizdir (1). Bu ilimizin toplam alanının %32'si platolardan oluşurken bu arazilerin önemli bir kısmı mera ve çayır alanları kaplamaktadır. Sahip olduğu coğrafik ve iklimsel özelliklerden dolayı Kars ilinin temel geçim kaynağı hayvancılık, hayvancılık içinde de özellikle büyükbaş hayvancılıktır (2,3).

TÜİK 2017 verilerine göre Türkiye'de 16 105 025 baş büyük baş hayvan bulunmakta bu hayvan varlığının da 467 346 başı, diğer bir ifade ile Türkiye büyükbaş hayvan varlığının %2.90'ı, Kars ilinde yetiştirilmektedir (4). Kars ili sahip olduğu büyükbaş hayvan sayısı ile Türkiye'de beşinci sırada yer almaktadır (5). TÜİK 2017 yılı verilerine göre Kars'ta yetiştirilen büyükbaş hayvan varlığının kültür, melez ve yerli ırklara göre sayıları ise sırasıyla 100 474, 334 605 ve 32 245 olarak bildirilmektedir (4). Yine TÜİK 2015 verilerine göre Kars'ta yıllık süt üretimi 626 629 ton olup, süt üretimi bakımından da ülkemizde beşinci sırada yer almaktadır (5).

Kars ilinde yetiştirilen süt inekleri genel olarak ilkbahar ve yaz aylarında merada/yaylalarda, sonbahar ve kış aylarında ise kapalı ahır ortamında beslenmektedir. Bu çalışma ile Kars ilindeki süt ineklerinin kış mevsimi süresince ahır ortamında iken hangi yöntemlerle beslendiği anket çalışması yoluyla ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu araştırma 01.04.2016 ile 15.10.2016 tarihleri arasında anket çalışması şeklinde yürütüldü. Kars il merkezinde faaliyet gösteren 10 adet, Kars'a bağlı Susuz, Arpaçay, Akyaka, Selim, Sarıkamış, Kağızman, Digor ilçelerinde faaliyet gösteren 5'er adet olmak üzere toplam 45 adet süt ineği işletmecisiyle yüz yüze görüşme yoluyla anket yapıldı. Ankette çalışmanın amacına yönelik sorular sorularak alınan cevaplar kayıt altına alındı. Kayıtlar excell programına aktarılarak sonuçlar yüzde cinsinden değerlendirildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kars ili genelinde kış mevsiminde işletme bazında beslenen süt ineği sayısına yönelik bilgiler Tablo 1'de verilmiştir. Tablo 1'den de görüldüğü üzere işletme başına düşen en yüksek süt ineği sayısının 11-15 baş (%32) arasında olduğu, bunu sırasıyla 6-10 (%24) ve 15-20 baş (%18) olan işletmelerin takip ettiği görülmektedir. İlk üçe giren en yüksek süt ineği oranının toplamının %74 olduğu dikkate alındığında Kars ili genelindeki işletmelerdeki süt ineği sayısının çok önemli bir kısmının 6 ile 20 baş arasında olduğu görülmektedir. Kars ilinin de içinde bulunduğu TRA2 bölgesi için işletme büyüklüklerinin tanımlanması hususunda 5 tip işletme büyüklüğü (Küçük ölçeğin altında kalan işletmeler, 1-4 baş; küçük ölçekte işletmeler, 5-24 baş; orta büyüklükte işletmeler 25-49 baş; büyük işletmeler, 55-300 baş; entegre işletmeler, 300 baş ve üzeri) uygun bulunmuştur (6). Önerilen bu işletme büyüklüğü sınıflandırmasına göre Kars ili 5 ile 25 başın yer aldığı küçük işletmeler kategorisinde yer almaktadır.

Tablo 1. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen hayvan sayısı ve oranları.
Table 1. The number of animals and their proportions during the winter season in dairy farms of Kars province.

Beslenen süt ineği aralığı, adet	Oran, %
1-5 arası	14
6-10 arası	24
11-15 arası	32
15-20 arası	18
21-25 arası	2
26-30 arası	6
31-35 arası	4
TOPLAM	100

Bu çalışmada Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde en fazla yetiştiriciliği yapılan ırkların montofon ve simental melezleri olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Bu çalışmada elde edilen tespit, Kars ilinde toplam 467 346 baş büyük hayvan bulunduğu bunun da 334 605 başının melez ırklar olduğu şeklindeki TÜİK 2017 verileriyle uyum

halindedir (4). Oransal çoğunluk bakımından melez ırkları, saf montofon ve simental ırkları takip etmektedir. Adı geçen melez ve saf ırkların yaygın

olarak yetiştirilmesinde bu ırkların bölgenin iklimsel ve coğrafik özelliklerine daha iyi uyum göstermesi etkili olmaktadır (7).

Tablo 2. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen hayvanların ırkları ve oranları.
Table 2. Breeds and proportions of animals fed during the winter season in dairy farms of Kars province.

İrk	Yerli	Montofon melezi	Simental melezi	Montofon	Simental
Oran, %	6	74	68	28	26

Kars ilindeki süt sığırcılık işletmeleri genellikle dağınık yapıda, ölçekleri düşük ve üretimde geleneksel yapıda ve hayvan başına elde edilen verim bakımından düşük süt üretimine sahiptirler (8). Kars ilinde kış aylarında beslenen süt ineklerinden elde edilen süt miktarına yönelik bilgilerin verildiği Tablo 3 incelendiğinde, Aksoy'un (9) bildirisine benzer olarak hayvan başına elde edilen süt verimi bakımından en yaygın miktarın 7-9 litre (%30) arasında olduğu, bunu sırasıyla 4-6 (%26), 10-12 (%14) ve 13-15 litre (%14) arasında süt veren işletmelerin izlediği

görülmektedir. Elde edilen süt miktarının 4 ile 15 litre arasında değişen işletmelerin oransal toplamının % 84 olduğu düşünüldüğünde genel anlamda Kars ilinde hayvan başına elde edilen süt miktarının düşük olduğu söylenebilir. Hayvan başına elde edilen süt miktarının düşük olması; yetiştirilen süt inekleri içerisindeki melez ırkların oranının yüksek olması (Tablo 2) ile montofon ve simental ırkı hayvanların kombine ırk olmaları, ilave beslemenin yeterli ve dengeli olmaması (Tablo 8) ve ahır ortamının yeterince modern olmamasıyla ilişkilendirilebilir.

Tablo 3. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış ayları süresince hayvan başına elde edilen günlük süt miktarı ve oranları.

Table 3. The daily amount and proportions of milk obtained per animal during the winter months in dairy farms of Kars province.

Elde edilen süt miktarı, lt/gün	Oran, %
Sağım yapmayanlar	2
1-3 arası	10
4-6 arası	26
7-9 arası	30
10-12 arası	14
13-15 arası	14
16-18 arası	4
TOPLAM	100

Kars ilindeki süt ineklerinin mera ortamından ahır ortamına alınmasının Ekim ayı içinde gerçekleştiği ve özellikle 11-30 Ekim arasında yoğunlaştığı görülmektedir (Tablo 4). Hayvanların meradan ahır ortamına alınmasının Ekim ayının sonuna doğru yoğunlaşması yetiştiricilerin mevsim şartlarının müsaade ettiği sürece meradan daha uzun süre yararlandıklarını, fakat yağmur ve özellikle kar yağmaya başlamasına bağlı olarak otlama şartlarının ortadan kalkmasıyla birlikte hayvanların ahır

ortamına alındığını göstermektedir. Kars ve Erzurum illerinde, toprağın karla kaplı olduğu gün sayısı yılda yaklaşık 100 gün olup (10), karla kaplı gün sayısının diğer bölgelere göre daha fazla olması ve kış şartlarının zorlu olması dikkate alındığında ülkemizin batısındaki hayvanlara göre daha fazla ahırda tutulmaktadır. Bu sebeple hayvanların merada geçen gün sayısı diğer illerden daha düşük olup, sığırlar yaklaşık 8 ay ahırda yemleme mecburiyetinde kalmaktadır (11,12).

Tablo 4. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde süt ineklerinin kış mevsimi için meradan alınarak ahıra getirilme tarihleri ve oranları.

Table 4. The dates and proportions of bringing dairy cows from pasture to barn for the winter season in dairy farms of Kars province.

Meradan ahıra getirilme tarihleri	Oran, %
1-10 Eylül arası	2
11-20 Eylül arası	-
21-30 Eylül arası	2
1-10 Ekim arası	10
11-20 Ekim arası	28
21-30 Ekim arası	58
TOPLAM	100

Tablo 5'ten de görüldüğü üzere Kars ilindeki süt ineği yetiştiricileri hayvanlarını 11 Nisan ile 20 Mayıs arasında meraya çıkarmaktadırlar. Bölgedeki gözlemlerimiz yetiştiricilerin hayvanlarını mera

otlarının istenilen boya ulaşılmadan otlatmaya çıkardığı, diğer bir ifade ile erken otlatma yapıldığı yönündedir. Yetiştiricilerin meraların erken otlatılmaması yönünde eğitilmesine ihtiyaç vardır.

Tablo 5. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde süt ineklerinin ahırdan alınarak meraya çıkarılma tarihleri ve oranları.

Table 5. The dates and proportions of bringing dairy cows from barn to pasture in dairy farms of Kars province.

Meraya çıkarılma tarihleri	11-20 Nisan arası	21-30 Nisan arası	1-10 Mayıs arası	11-20 Mayıs arası	TOPLAM
Oran, %	24	40	8	28	100

Bu çalışmanın ana amaçlarından birisi olan kış ayları süresince Kars ilindeki süt ineklerine verilen kaba yemlerin neler olduğunu belirlemeye yönelik sonuçların verildiği Tablo 6'dan da anlaşılacağı üzere işletmelerde en yaygın kullanılan kaba yem kaynağının arpa-buğday samanları (%98) ile çayır kuru otu (%82) olduğu, bunları sırasıyla korunga (%38), mısır silajı (%36), yulaf hasılı+fiğ kuru otu (%30), şeker pancarı posası (%16), yulaf hasılı (%14) ve yoncanın (%12) takip ettiği görülmektedir. Tablo 6'dan anlaşılın önemli bir durum ise işletmelerde birden fazla kaba yem kaynağının kullanıldığıdır. Ülkemiz şartlarında kaba yem denildiğinde ilk akla gelen ve pratikte yaygın olarak kullanılan samanlardır (13). Bu çalışmada da en yaygın kullanılan kaba yem kaynağının samanlar olduğu bir kez daha karşımıza çıkmıştır. Bu çalışmada dikkati çeken diğer bir husus Kars ilinde kullanılan kaba yem kaynakları içerisinde çayır kuru otu kullanımının çok yaygın (%82) olmasıdır. Bu durum başta Kars ilimiz

olmak üzere Kuzey Doğu Anadolu Bölgemizin çayırlar bakımından zengin olmasıyla ilişkilidir. Yapılan birçok çalışmada Kars ilinde uzun yıllardır korunarak bugünlere kadar getirilmiş olan çayırların bulunduğu ve bu çayırların besinsel kompozisyonunun iyi kalitede olduğu belirtilmiştir (14-16). Dikkati çeken diğer bir husus ise Kars ilinde korunga kuru otu kullanımının yaygın oluşudur (%38). Bilindiği üzere korunga soğuk iklimlere kolay adapte olan ve çok kaliteli topraklara gereksinim duymadan yetiştirilebilen bir yem bitkisidir (17). Kars ilinde de bu şartlar olduğu için korunga yetiştiriciliği artarak devam etmektedir. Bu artışta Tarım ve Ormanlık Bakanlığı'nın yem bitkileri yetiştiriciliğine yönelik olarak vermiş olduğu destekler olumlu etki yapmaktadır. Yine bu çalışmaya yansıyan ve dikkati çeken diğer bir husus Kars ilinde yulaf hasılı-fiğ kuru otu ikili karışımı ve sadece yulaf hasılı yaygın olarak kullanılan kaba yem kaynaklarından olmasıdır.

Tablo 6. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince ahırda beslenen süt ineklerine yedirilen kaba yem çeşitleri ve oranları.

Table 6. The varieties and proportions of roughage fed to dairy cows fed during the winter season in dairy farms of Kars province.

Kaba yem çeşitleri	Oran, %
Saman (Arpa+Buğday)	98
Çayır kuru otu	82
Korunga kuru otu	38
Mısır silajı	36
Yulaf hasılı + Fiğ kuru otu	30
Şeker pancarı posası	16
Yulaf hasılı	14
Yonca kuru otu	12

Tablo 7'den de anlaşılacağı üzere kış aylarında Kars ilindeki süt ineği işletmelerinin tümünde hayvanlara konsantre yem verilmektedir. Tüm işletmelerin hayvanlarına konsantre yem vermesi yetiştiricilerin süt sığırlarını Tablo 6'da belirtilen kaba yemlere dayalı olarak beslemelerinin ihtiyacı karşılayamayacağını bildiklerini göstermektedir.

Tablo 8. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince süt ineklerinin tükettikleri konsantre yem çeşitleri ve oranları.

Table 8. Concentrated varieties and rates of dairy cows consumed during the winter season in dairy farms in Kars province.

Konsantre yem çeşidi	Arpa kırması	Siğir süt yemi	Buğday kırması	Siğir besi yemi	Yulaf kırması	Fiğ kırması	Kepek
Oran, %	66	60	16	14	12	10	10

Bu çalışmada elde edilen bilgiler Kars ilindeki süt ineği yetiştiricilerinin %48'inin hayvanlarını günde 3 öğün, %44'ünün 2 öğün halinde beslediğini göstermiştir (Tablo 9). Günde 2 veya 3 öğünde besleme yapılıyor olması rumen ekosistemindeki stabilitesinin korunması açısından yararlı bir uygulama olarak düşünülebilir. Ayrıca günde 2 veya 3 kez hayvanları gözlemlene imkânı da gerçekleştirilmiş olmaktadır. Yetiştiricilerin %8'i ise günde 4 öğün halinde besleme yapmaktadırlar.

Tablo 7. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerinin konsantre yem tüketimi durumu ve oranları.

Table 7. Concentrated feed consumption status and rates of dairy cows fed during the winter season in dairy farms in Kars province.

Konsantre yem verilme/verilmeme durumu	Oran, %
Konsantre yem veren işletmeler	100
Konsantre yem vermeyen işletmeler	-
TOPLAM	100

Kars ilindeki süt ineklerine kış ayları süresince verilen konsantre yemler içerisinde en yaygın olanlarının sırasıyla arpa kırması (%66) ve siğir süt yemi (%60) olduğu görülmektedir (Tablo 8). Bunların dışında yaygın olmamakla birlikte buğday, siğir besi yemi, yulaf, fiğ ve kepekte kullanılmaktadır. Süt ineklerinde besi yeminin kullanıldığı işletme sahiplerine niçin besi yemi kullandıkları sorulduğunda geçmişten beri böyle yaptıkları cevabının alınması, bazı işletme sahiplerinin besi sığırları ve süt inekleri için ayrı ayrı yemlerin kullanılması gerektiği bilgisine sahip olmadığını göstermektedir.

Tablo 9. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerinin yemlerin kaç öğün halinde verildiği ve oranları.

Table 9. In dairy cows in Kars province, how many meals are served and the proportions of the dairy cows fed during the winter season.

Öğün sayısı	2	3	4	TOPLAM
Oran, %	44	48	8	100

İnek sütünün yaklaşık %87'lik kısmı su olduğu için (18) süt ineklerinde ve özellikle yüksek süt verimli ineklerde yeterli su tüketimi önemli bir husustur (19). Gerekli suyun karşılanması için yetiştiriciler tarafından öğünler halinde su verilmekte ya da otomatik suluklardan yararlanılmaktadır. Bu çalışmada elde edilen veriler Kars ilindeki süt ineği yetiştiricilerinin %78'inin hayvanlarını günde 2, %16'sının ise 3 öğün halinde suladığını göstermektedir. (Tablo 10). Sadece %2 oranında ise otomatik suluk bulunduran işletme olduğunu göstermiştir. Kars ilindeki sulama sisteminin öğünlere dayalı olması, mevcut ahır sistemlerinin geleneksel yapıda olması ve modern ahır sayısının oldukça sınırlı olmasıyla ilişkilidir.

Tablo 10. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerine günlük su verilme sıklığı ve oranları.

Table 10. The frequency and proportions of daily watering of dairy cows fed in Kars province dairy farm during the winter season.

Su verilme sayısı, öğün/gün	1	2	3	Otomatik suluk	TOPLAM
Oran, %	4	78	16	2	100

Süt ineklerine verilen kaba ve konsantre yemlerin hayvanlara verilme yöntemiyle ilgili olarak bu yemlerin ayrı ayrı veya karıştırılarak verilmesi gibi alternatifler bulunmaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Kars ilindeki süt ineği yetiştiricilerinin % 98'inin kaba ve konsantre yemleri karıştırarak hayvanlarına verdiklerini göstermiştir (Tablo 11). Yetiştiriciler geleneksel olarak atalarından gördükleri şekilde ya da bilinçli olarak kaba ve konsantre yemleri karıştırarak sunmaktadırlar. Diğer taraftan bu uygulama ile kuru madde tüketimi artar, yem madde seçimi azalır, süt yağı iyileşir, rumen pH'sı optimum sınırlarda kalır. Ayrıca bu uygulama rumendeki şartların devamlılığı açısından oldukça yerinde bir uygulamadır (19,20).

Tablo 11. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince süt ineklerine yedirilen konsantre ve kaba yemlerin hayvanlara verilme şekilleri ve oranları.

Table 11. The types and proportions of concentrate and roughage feeds fed to dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Konsantre yemlerin verilme şekilleri	Oran, %
Kaba ve konsantreler yem karıştırılarak	98
Kaba ve konsantre yemler ayrı ayrı (konsantre yem sağımında)	2

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Kars ilindeki tüm işletmelerde kış ayları süresince süt ineklerine yalama taşı şeklinde tuz sunulduğunu göstermiştir (Tablo 12). Bu durum yetiştiricilerin süt ineklerinin beslenmesinde tuz kullanılmasının gerekli olduğu bilgisine sahip olduklarını göstermektedir.

Tablo 12. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince süt ineklerin'de tuz verilme oranları.

Table 12. Rates of salt administration in dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Tuz kullanma/kullanmama durumu	Oran, %
Tuz kullanan işletmeler	100
Tuz kullanmayan işletmeler	-
TOPLAM	100

Vitamin ve mineraller süt ineklerinin beslenmesinde mutlaka üzerinde durulması gereken besin maddeleridir (19,20). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde yalama bloğu şeklinde vitamin-mineral bloğu kullanımının hiç olmadığını göstermiştir (Tablo 13). Bu durum yapılan bu çalışmada oldukça dikkati çeken bir husustur. Yetiştiricilerle yapılan görüşmelerde elde edilen bilgiler, vitamin-mineral yalama bloklarının sadece buzağılara verildiği, erişkin büyükbaş hayvanlara

verilmesine gerek olmadığı şeklindedir. Ancak özellikle meraya çıkarılma döneminde hayvanlarda görülen dikkati çekecek derecedeki kondisyon düşüklüğü, kıl dökülmesi, kılların karışık ve mat bir görünümde olması durumu kış ayları süresince vitamin ve mineral madde bakımından beslemede yetersiz olduğunu düşündürmektedir. Tablo 16'da süt ineği işletmelerinde nadiren pika görülme oranının %70 olarak tespit edilmiş olması da bu görüşümüzü destekler niteliktedir. Yetiştiriciler arasındaki erişkin sığırlara vitamin-mineral takviyesine gerek yoktur anlayışının bir an önce düzeltilmesi gerekmektedir.

Tablo 13. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince süt ineklerinde vitamin-mineral yalama bloğu kullanımı ve oranları.

Table 13. The use and rates of vitamin-mineral lime block in dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Vitamin-Mineral bloğu kullanma/kullanmama durumu	Oran, %
Vitamin-Mineral kullanan işletmeler	-
Vitamin-Mineral kullanmayan işletmeler	100
TOPLAM	100

Bu çalışmada üzerinde durulan diğer bir hususta Kars ilindeki süt ineği yetiştiricilerinin hayvanlarını beslerken veteriner hekim ve zootechnist gibi teknik personelden besleme tekniklerine yönelik destek alıp-almadığının ortaya çıkarılmasıydı. Elde edilen sonuçlar Kars ilindeki süt ineği işletmelerin % 94'ünün hayvanlarını besleme konusunda teknik destek almadıklarını göstermiştir (Tablo 14). Bu durum bölge insanının hayvanlarını besleme konusunda geleneksel besleme yöntemlerine güçlü bir şekilde bağlı kaldığını, teknik destek almayı tercih etmediklerini göstermektedir. Diğer bir ifade ile kendilerini hayvan besleme konusunda yeterli gördüklerini düşündürmektedir. Fakat bu durumun düzeltilmesine ihtiyaç vardır.

Tablo 14. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen hayvanlara besleme konusunda teknik destek (Veteriner hekim, zootechnist) alınıp alınmaması durumu ve oranları.

Table 14. The status and rates of receiving technical support (Veterinary, zootechnist) for feeding dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Teknik destek alma/almama durumu	Oran, %
Teknik destek alan işletmeler	4
Teknik destek almayan işletmeler	96
TOPLAM	100

Bu çalışmada Kars ilinde kış ayları süresince beslenen süt ineklerinde indigesyon, ishal, timpani gibi sindirim sistemi hastalıklarının görülme sıklığının %50 oranında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 15). Sindirim sistemi rahatsızlıklarının görülmesinde Kars ilinde kış aylarının çok soğuk geçmesinin yanı sıra özellikle çayır kuru otlarının yığın şeklinde muhafaza edilmesi ve yığınların özellikle dış kısımlarında küflenmeye bağlı mikotoksin oluşumu (14), soğuk su içirilmesi ve ahır şartlarının hayvanların refahı için yeterli olmaması gibi hususlar etkili olabilir.

Tablo 15. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerinde sindirim sistemi hastalıklarının (ishal, timpani, indigesyon) görülme durumu ve oranları.

Table 15. The incidence and rates of digestive system diseases (diarrhea, tympanic, indigestion) in dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Hastalık görülme/görülmemesi durumu	Oran, %
Sık hastalık görülen işletmeler	-
Nadir hastalık görülen işletmeler	50
Hastalık görülmeyen işletmeler	50
TOPLAM	100

Bu araştırmada ortaya konulmaya çalışılan hususlardan bir tanesi de kış ayları süresince hayvanlarda özellikle P ve Na başta olmak üzere mineral yetersizliğine ait belirtilerin olup-olmadığını ortaya koymaktı. Elde edilen sonuçlar nadiren pika belirtilerinin görüldüğü (%70) şeklindedir (Tablo 16). Daha önce de belirtildiği üzere ilkbahar mevsiminde

hayvanların ahır ortamından mera ortamına ilk çıktıklarında kıllarının karışık bir halde olması, kıllarının mat renkli olması ve kondisyonlarının düşük olması yönündeki gözlemlerimiz kış ayları süresince hayvanlarda mineral yetersizliği olduğunu düşündürmektedir.

Tablo 16. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerinde pika görülme durumu ve oranları.

Table 16. The incidence and rates of pica in dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

Pika görülme/görülme durumu	Oran, %
Sık pika görülen işletmeler	-
Nadir pika görülen işletmeler	70
Pika görülmeyen işletmeler	30
TOPLAM	100

Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri de Kars ilindeki süt ineklerinin kış ayları süresince beslenmesinde karşılaşılan sorunların neler olduğunun ortaya çıkarılmasıdır. Tablo 17'de görüldüğü üzere işletmeler için en önemli problem olarak yemlerin pahalı oluşu %66 oranıyla birinci sırada yer almaktadır. Bunu %60 ile sütün ucuz olması takip etmektedir. Yemlerin pahalı olması yetiştiricilerin hayvanlarını beslerken yeterli miktarda yem verememesini beraberinde getirmektedir. Yeterli miktarda yem verilememesi de hayvan başına elde edilen süt miktarını düşürmektedir (19). Kars ilindeki işletmelerde hayvan başına elde edilen süt miktarının düşük oluşu da (Tablo 3) bu görüşümüzü destekler niteliktedir.

Tablo 17. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinde kış mevsimi süresince beslenen süt ineklerinde beslemeye yönelik olarak görülen en önemli problemler ve oranları.

Table 17. The most important problems and rates of feeding in dairy cows in Kars province dairy farm during the winter season.

En önemli besleme problemleri	Oran, %
Yemler pahalı	66
Süt ucuz	60
Yemlerin kalitesinde standart olmaması	4
Besleme problemi yok	12

Bu çalışmada Kars ilinde mevcut süt ineği işletmelerin tamamının süt ineği yetiştiriciliğini devam ettirme isteğinde olduğu ortaya konulmuştur (Tablo 18). Yetiştiriciliği devam ettirme isteğinin gerekçeleri olarak; bölgenin hayvancılık yapmaya oldukça elverişli olması, hayvancılık dışında yapılacak alternatif iş sektörlerinin kısıtlı olması, çayırlardan elde edilen çayır kuru otlarının nispeten bol olmasından dolayı bu otların kış aylarındaki beslemeye sevk edilerek yem giderlerinin aşağıya çekilmesi, bölgenin sosyo-kültürel özellikleri ve hayvancılıktan karlılık elde edilmesi söylenebilir.

Tablo 18. Kars ilindeki süt ineği işletmelerinin süt inekçiliğini devam ettirip ettirmeme yönündeki görüşleri ve oranları.

Table 18. The opinions and rates of dairy farmers in the province of Kars in terms of whether to maintain dairy cows.

Besiciliği devam ettirip ettirmeme yönündeki görüşler	Oran, %
Besiciliği devam ettirmeyi düşünen işletmeler	100
Besiciliği devam ettirmeyi düşünmeyen işletmeler	-
TOPLAM	100

Anket şeklinde yapılan bu çalışma sonucunda; Kars ilinde kış aylarında yapılan süt ineği besisinde en fazla kullanılan kaba yemlerin saman, çayır kuru otu ve korunga, en fazla kullanılan konsantre yemlerin arpa kırması ve sığır süt yemi olduğu belirlenmiştir. İşletmelerin tamamında süt ineklerine konsantre yem verildiği, kaba ve konsantre yemlerin karıştırılarak verildiği tespit edilmiştir. Süt ineklerinin %44 oranında 2 öğün, %48 oranında 3 öğünde beslendiği, %78 oranında ise 2 öğün halinde sulandığı belirlenmiştir. Süt ineği işletmelerinin tamamında tuz kullanıldığı, fakat vitamin-mineral yalama bloğu kullanılmadığı tespit edilmiştir. Süt ineği işletmelerinin %96'sının Veteriner Hekim ve Zootechnik gibi teknik personelden beslenmeye yönelik destek alınmadığı belirlenmiştir. Kış mevsimi beslemelerinde indigesyon, ishal ve timpani gibi sindirim sistemi rahatsızlıklarının nadiren görülme sıklığının %50, pikanın nadiren görülme sıklığının %70

olduğu tespit edilmiştir. Besleme ile ilgili en önemli problemin yemlerin pahalı olması olduğu belirlenmiştir. Süt sığırı işletmecilerinin tamamının faaliyetlerini devam ettirme niyetinde olduğu tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; Kars ilindeki süt ineği işletmelerinin atadan görme (geleneksel) besleme yöntemlerine bağlı olarak süt ineklerini besledikleri, teknik destek almaya sıcak bakmadıkları, besleme konusunda ciddi problemlerle karşılaşmadıkları, fakat özellikle vitamin-mineral yetersizliklerinin olabileceği anlaşılmakta olup, yetiştiricilerin küçük yönlendirme tavsiyeleriyle hayvanlarını yeterli ve dengeli bir şekilde besleyebilecekleri kanaatine ulaşılmıştır.

KAYNAKLAR

- Demir M., 2016. Kars ilinde büyük ve küçükbaş hayvancılık. Doğu Coğrafya Dergisi, 21, 39-61.
- Ünal Ç., 2003. Erzurum'un tarım potansiyeli. Doğu Coğrafya Dergisi, 8, 189-211.
- Ünal Ç., 2004. Erzurum'un hayvancılık potansiyeli. Doğu Coğrafya Dergisi, 9, 257-274.
- TÜİK, 2018. Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2017. Türkiye İstatistik Kurumu, Haber Bülteni, Sayı 27704, 07 Şubat 2018.
- TÜİK, 2017. Hayvansal Üretim İstatistikleri, 2016, İllere Göre Süt Üretimi Dağılımı. Türkiye İstatistik Kurumu, Haber Bülteni, Sayı 24655, 07 Şubat 2017.
- SERKA, 2011. Serhat Kalkınma Ajansı. Doğu Anadolu Bölgesi Büyükbaş Hayvancılık Çalıştay Raporu, Temmuz 2011.
- Aydın E., Sakarya E., 2012. Kars ve Erzurum illeri entansif sığır besi işletmelerinin ekonomik analizi. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18, 997-1005.
- Demir P., Derbentli Ö., Sakarya E., 2012. Kars ilinde bulunan mandraların etkinliğinin veri zarflama analizi ile ölçülmesi. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 18, 169-176.
- Aksoy A R., 1995. Kars Kaz üretme istasyonundaki Esmer ve Simental sığırların süt verimleri. YYU Vet Fak Derg, 6, 55-57.
- Aksakal V., Hasimioğlu S., Bayram B., Dellal G., Erdogan Y., Altun HÜ., Cengiz MM., 2016. Sustainability organic agriculture and livestock production with respect to European Union in Eastern Anatolia and East Black Sea Regions. Turkish J Agr Food Sci Tech, 4, 1024-1030.
- Koçyiğit R., Aydın R., Diler A., 2015. Erzurum İli büyükbaş hayvancılığının durumu ve gelişmesine yönelik öneriler. Alinteri J Agr Sci, 29, 34-46.
- Karakuzulu Z., Arıcı F., Dumansızoğlu M., 2017. Doğu Anadolu Bölgesi'nin biyogaz enerji potansiyeli. ASOS Journal, 39, 541-554.
- Atalar A., Çetinkaya N., 2017. Improvement the lignocellulosic complex digestibility of straw by biological treatment. Turkish J. Agr Food Sci Tech, 5, 1720-1725.
- Arslan C., Eşsiz D., 2009. Nutrient composition and mycotoxin residues in the hay stored as stack forms during the storage period, and aflatoxin M₁ in the milk of the cows fed by them. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 15, 697-704.
- Arslan C., Eşsiz D., 2009. Establishing the optimum cutting time and additives for pasture grass silage and its mycotoxin levels. Kafkas Univ Vet Fak Derg, 15, 531-538.
- Arslan C., Tufan T., 2011. Determination of herbage yield, nutrient composition and optimum harvesting date of pastures in Kars district. Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg, 6, 131-138.
- Coşkun B., Şeker E., İnal F., 2000. Yemler ve Teknolojisi (3. Baskı). Selçuk Üniversitesi, Veteriner fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
- Coşkun B., Şeker E., İnal F., 1997. Hayvan Besleme Ders Notları. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi, Konya.
- Ergün A., Çolpan İ., Yıldız G., Küçükersan S., Tuncer ŞD., Yalçın S., Küçükersan MK., Şehu A., Saçaklı P., 2017. Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. 7. Baskı Pozitif Yayınları, Ankara.
- Ergün A., Çolpan İ., Yıldız G., Küçükersan S., Tuncer ŞD., Yalçın S., Küçükersan MK., Şehu A., Saçaklı P., 2016. Yemler Yem Hijyeni ve Teknolojisi. 6. Baskı Pozitif Yayınları, Ankara.



Behaviours of Drugs in the Milk - A Review

Zeynep ÖZDEMİR¹, Bünyamin TRAŞ²✉

1. Anatolia Medicine & Chemical Industrial Co., Konya, TURKEY.
2. Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Konya, TURKEY.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
06.06.2017	12.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/Tocitethisarticle:
Özdemir Z, Traş B: Behaviours of Drugs in the Milk - A Review. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 364-372, 2018.
DOI:10.17094/ataunivbd.319443

Abstract: Milk is a food containing many biologically active substances that have an important place in the nourishment of newborns and adults. The transition of the drugs used in the treatment, as well as the environmental pollutants to milk cause a potential risk for consumer health as well as economical losses due to exceed of the legal limits of these compounds set by authorities. The transition of these chemicals to milk is complex; while active transport and passive diffusion play were found to have an important role. The transition abilities of the drugs into milk are defined by milk/plasma ratio. The M/P ratios of the drugs are affected by the composition of the milk and the physicochemical properties of the drug. The concentration of the drugs in the milk depends on the factors of the drug (protein binding, ionization, molecular weight, lipophilicity, drug-drug and drug-nutrient interactions) and organism (race, species, lactation period, parity, disease and nutrition). If the transition properties of the compounds of concern are known or able to be modeled in kinetic applications, it can be useful for preventing milk from drug residues. The success of mastitis treatment depends on the proper use of drugs and knowing of the behaviour of drugs in the milk.

Keywords: Behaviour, Drug, Factor, Milk, Transition.

İlaçların Sütteki Davranışları - Derleme

Öz: Süt, yeni doğanlar ve yetişkinlerin beslenmesinde önemli yeri olan birçok biyolojik aktif madde içeren bir besindir. İnsan ve hayvanların tedavisinde kullanılan ilaçların ve çevresel kirlenmelerin süte geçme yeteneği, sütü sağlık ve ekonomik açıdan sorunlu hale getirmektedir. Kaliteli ve güvenli gıda üretimine yönelik yasal ve bilimsel uygulamalar bu sorunları önlemeyi amaçlamaktadır. Aktif transport ve pasif difüzyon, ilaçların süte geçişinde önemli rol oynamakla birlikte diğer mekanizmaların da etkin olduğu bilinmektedir. İlaçların süte geçişleri süt/plazma oranı ile belirlenir. Süt/plazma oranı sütün bileşiminden ve ilacın fizikokimyasal özelliklerinden etkilenir. Sütteki ilaç konsantrasyonu, ilaca (proteine bağlama, iyonizasyon, molekül ağırlığı, lipofiliklik, ilaç-ilaç ve ilaç-besin etkileşimi) ve canlıya (ırk, tür, laktasyon periyodu, doğum sayısı, hastalık ve beslenme) bağlı olarak değişiklik gösterir. Söz konusu bileşiklerin geçiş özelliklerinin bilinmesi veya kinetik uygulamalarla modellenmesi süte ilaç kalıntılarının önlenmesinde faydalı olabilir. Mastitis tedavisinin başarısı, ilaçların doğru kullanılması ve ilaçların sütteki davranışlarının bilinmesine bağlıdır.

AnahtarKelimeler: Davranış, Faktör, Geçiş, İlaç, Süt.

✉Bünyamin TRAŞ

Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pharmacology and Toxicology, Konya, TURKEY.
e-mail: btras@selcuk.edu.tr

INTRODUCTION

Milk is defined as the biological fluid that is produced in the mammary gland following by birth in all mammalian species. The composition of the milk consists of mainly emulsified fat globules, lactose and soluble proteins that form solutions with colloidal dispersed proteins. Milk also contains various minerals, vitamins, enzymes and dissolved gases. The passive diffusion is primary mechanism that plays the key role in the transition of drug from plasma to milk. In the transition of drugs to the milk, there are transport mechanisms other than passive diffusions. Milk concentrations of cimetidine and nitrofurantoin are founded higher than predicted concentrations in humans (1,2). Active transport plays an important role in the passage of organic compounds such as benzylpenicillin across the blood-milk barrier. However, probenecid is a known inhibitor of active transport of organic acids at epithelial barriers. In an experimental study, probenecid has reduced the excretion of benzylpenicillin from kidney (3). The existence of carrier-mediated transport system/systems in the mammary gland has been revealed in experimental studies using rats. In these studies, it has been indicated that dipyrindamole reduced more the milk/serum ratio of nitrofurantoin than 60% and the cimetidine than 80% (4,5). Other mechanisms such as pinocytosis and exocytosis are effective mechanisms for the transition of drugs into the milk. It has been demonstrated that non-linear kinetic (saturation) is possible in the transition of compounds to milk such as aminopyrine, N-acetylated paraaminohippuric acid and N-acetylated sulfanilamide (5). ATP-binding-cassette (ABC) is a transmembrane protein that is actively involved in the transport of biological substances and xenobiotics. P-glycoprotein and Multi-Drug Resistance Protein (MRP), particularly the Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) from the ABC family, play a role in the transit of the drug to milk. BCRP is highly expressed in breast tissue especially during the last period of pregnancy and lactation period (6,7). Bcrp1 substrate

concentrations in wild type lactating mouse milk has been higher compared to transgenic lactating mice without Bcrp1 transmembrane protein (Bcrp1 -/-) (6). Genetic variations of BCRP should also be assessed in the transit of the drug to milk. Variations in the expression and/or function of BCRP could be lead to significant changes in the pharmacokinetics of the BCRP substrates in the milk. Y581S is one of the BCRP polymorphisms, which have caused to increase transition of danofloxacin to the milk. In addition, the heterozygous variant Y/S of the Y581S polymorphism have increased to transition of danofloxacin to milk much more than homozygous variant Y/Y (8). Otero et al. (9) found that riboflavin transports more efficiently *in vitro* by the Y581S. Also the same authors have determined that uric acid and enterolactone (substrates *in vitro* of the bovine ABCG2 variants) are actively secreted into milk with a two-fold increase in the milk/plasma ratio for Y/S with respect to Y/Y cows. Y581S polymorphism is responsible for production and composition of milk (10). BCRP variants can be also different between species. The metabolites of triclabendazole (triclabendazole sulphoxide and sulphone) have lower inhibitor effect on BCRP variants in sheep than in cattle. Especially, these metabolites inhibit the bovine Y581S variant (11). The *in vitro* transport of ciprofloxacin by the S581 variant has been more efficient when compared to the Y581 variant. Also the administration of enrofloxacin to Y/Y 581 and Y/S 581 cows has revealed that the plasma concentrations of enrofloxacin and ciprofloxacin are significantly lower in Y/S animals (12). The transition ability of the drugs into milk is defined by milk/plasma (M/P) ratio. M/P rate is affected by composition of the milk and physicochemical properties of the drug. M/P ratio can be estimated by using the values of octanol/water partition rate, binding to plasma proteins and the pKa of drugs. The drugs with a high M/P ratio are actively secreted to the milk (13). Maternal plasma drug concentration directly affects drug concentration in the milk. On the

other hand, the drug concentration in the blood is not affected only by the maternal dose; this ratio can be changed by the maternal drug metabolism. The drug metabolism is genetically determined and shows variation in mammals. Plasma concentration of clomipramine can be shown difference by more than 50 times among the dogs (14).

1. Factors Affecting Drug Transition to the Milk

Physiological changes such as hormonal changes are observed during pregnancy and lactation period. In pregnancy, maternal plasma drug concentration is affected by changing physiological factors. Some plasma proteins such as albumin and globulin increase during the lactation period. Researchers have indicated that there is a decreasing in concentration of blood protein during the last period of pregnancy and plasma protein concentration reaches normal levels during lactation (15). Changes in the pharmacokinetics of drugs in lactation period are often similar to changes in the pharmacokinetics of drugs in pregnancy. Contrary to indicated above Santschi and Papich (16) have found that there is no difference in the plasma distribution, excretion, and drug exposure (AUC) of gentamicin between mares in the last period of pregnancy as well as in the first period of lactation. The pharmacokinetics of the drugs can be affected by hormonal changes during postpartum and lactation period, also body fat percentage, body weight and body mass. It has been shown that lactation causes significant changes in plasma pharmacokinetics (clearance, increased volume of distribution and half-life) of drug when compared with pregnancy (17).

2. Factors Related to Living Organism

2.1. Species

Sheep milk contains more fat and protein than cow and goat milk. In two different experimental studies, doremeectin has been found to accumulate more in the milk of sheep than in the milk of goat, despite the same dosage regimen (18,19). Similar results have been obtained for danofloxacin studies in lactating cows and sheeps, the concentration of

danofloxacin in sheep milk has been shown to be higher (20,21). It can be said that lipophilic drugs are more likely to pass sheep milk, which has a higher fat rate than goat and cow milk.

2.2. Disease

Physical and chemical changes in the milk and breast tissue diseases affect the drug transition to milk. Inflammation products and edema disrupt the distribution of drugs by clogging milk ducts and creating pressure. Drugs bonded to milk proteins are pharmacologically ineffective. Since the amount of milk protein (casein, α -lactalbumin, β -lactoglobulin) reduce, the amount of free drug in milk increases in mastitis cases. The other change, which can affect drug passage into tissue, is fibrosis. Fibrosis decreases the drug distribution in tissues. Depending on these factors, the pharmacokinetics of drugs in milk can be affected at different levels. Yield of milk could be effective on the excretion of drugs by milk. The withdrawal times of drugs from the milk takes more time because of reduced milk yield in cattle with clinical mastitis (22). In an experimental study conducted on healthy and mastitic cows, the withdrawal time of azithromycin has been found to be prolonged in mastitic cows (23). Although administered in the same dosage regimen, cefacetile accumulates in mastitic cows milk than healthy ones (24). Sezgin and Tras (25) have determined that mastitis cause the change in pharmacokinetic of albendazole in milk [area under the curve (AUC), biological half-life and M/P ratio] but mastitis hasn't changed pharmacokinetic of triclabendazole and fenbendazole. After intravenous administration, milk concentration of flunixin meglumine have found different in mastitic and healthy cows at all time points (26). The same authors have stated that concentration of flunixin meglumine in mastitic cow milk has been higher than healthy ones. In contrast to the parent drug, 5-hydroxy flunixin concentrations have been significantly higher in healthy cow milk at both 2 and 12 hours. The results of another experimental study have reported that the AUC of norfloxacin in milk is significantly lower in the infected quarters of the

mastitis groups (subclinical and clinical group) when compared to the values in milk from healthy quarters of the same udder. Also, they determined concentration of norfloxacin in milk is higher than in serum (27). There are not enough studies about the effect of mastitis on transporter-mediated secretions of drugs into milk. Yagdiran et al. (28) have found that no significant differences were observed for gene expression of BCRP after *S.aureus* challenge. On the other hand, another study revealed that the gene expression of Bcrp1 has been downregulated in mouse model of *S.aureus*-induced mammary inflammation (29). Other diseases such as endometritis can also affect the drug behaviours in the milk. Kumar et al. (30) have determined that concentration of ceftriaxone in milk is greater in healthy cows than endometritic cows at 12 and 24 h after drug administration, whereas endometritic cows had greater ceftriaxone concentrations in milk compared to healthy cows at 36 h.

2.3. Lactation Period and Parity

Rates of milk protein and fat at different periods of lactation have been shown to alter drug excretion from milk (31). There is a positive relationship between amounts of protein and fat in the milk. In cows, milk yield increases parallel to the increasing of parity and milk yield reaches the maximum level at 4-5th births. This increase is related to breast volume. The raising in milk yield causes to increase the excretion of drug by milk (22).

2.4. Breed

Breeds can affect the drug transition into milk. It has already been mentioned that the rate of milk protein and fat is effective on the transition of drugs to milk. For example, milk protein and fat ratios of Jersey and Guernsey breeds are higher than other breeds. Lipophilic drugs, which show affinity to milk proteins, can be more concentrated in the milk of these breeds (22).

2.5. Nutrition

Milk composition is related to acetate/propionate ratio of the ration. In addition,

nutritional characteristics such as the herbage quality, the roughage/concentrated feed ratio and the amount of fat in the feed can affect the milk composition. Imbalances in nutrition (low energy/protein ratio) can decrease rates of milk fat and protein. If the concentrate feed ratio is higher than the roughage feed, the milk fat ratio tends to decrease. Cows fed with rich rations from vegetable oil have low milk fat. Decreasing in short and medium chain fatty acid content in the ration affects milk fat ratio negatively. Soybean, which has the highest feed value among legumes, is widely used in animal feeding. Soybean has an inhibitory effect on activity of BCRP transmembrane protein (32).

3. Factors Related to Drugs

3.1. Route of Administration

Every drug used in treatment passes to milk at more or less levels. The route of administration affects the passage of drugs to milk. Parenterally applied drugs are absorbed easily and rapidly than oral administered drugs. Intravenous administered drugs more accumulate in the milk compared with different parenteral routes (23). Also, it should also be considered that intrauterine drug application to lactating animals can cause drug residue in milk (33).

3.2. Protein Binding

Drugs are found as free or bound form in the circulation. While free drugs can pass to tissue and biological fluids such as milk, bound drugs can't. There are specific proteins (casein, lactalbumin, α and β lactoglobulins) in milk produced by the breast epithelial cells which bind drug molecules. The excretions of drugs that bind to milk proteins at high ratios are rapid and distribution to tissues is low (22). In mastitis disease, the percentage of milk protein is increased. In a study conducted on cows with mastitis, it has been found to be increasing in proportion of drugs bonded to milk proteins following intramammary drug administration. Also, it has been concluded that binding to tissue proteins could prolong the withdrawal time in the milk (27).

3.3. Ionization and pH

Ionization rates of drugs with weak acid or basic in aqueous media are related to the pH of medium and the pKa of drugs. Most of non-ionic drugs have higher solubility in lipid and pass across the membrane easily. While the pH of the plasma is constant, the pH of the milk is variable. Except of gangrenous mastitis, the pH of the milk shifts to alkaline in mastitis cases. The ionization ratio of the drug in the milk is also dependent on the severity of the infection. Excretion of weak acid and basic drugs with milk are determined by the pKa value and plasma concentrations of drug and the pH of the plasma and milk (34). As the pH of the milk is lower than the pH of the plasma, weak base drugs accumulate in milk more than weak acid drugs. Traş et al. (35) found that the sulphadoxin concentration in mammary quarters applied basic solution was higher than in quarters applied acidic solution and the difference was to be significant. Due to the increased vascular permeability in inflammatory diseases, drug transition from plasma to milk increases. In mastitis cases, intramammary drug administration causes increase in drug transition from milk to plasma. The effect of pKa on drug concentration in milk has been demonstrated in studies with sulfonamides. Sulfacetamide has a low M/P ratio (0.08), because of a low pKa (5.4), sulfanilamide has a pKa of 10.4 so M/P ratio is 1.00 (36).

3.4. Molecular Weight

Transition of drugs and other chemicals into milk depends on the molecular size and molecular weight. Drugs with small molecular weight and molecule size pass to milk more easily. Ethanol (molecular weight 120) passes rapidly from the plasma to milk and reaches a high concentration in the milk. It is not possible for drugs of ≥ 600 molecular weight to transition at high concentrations into the milk. Heparin (30.000) and insulin (6.000) molecules are not found in milk because their molecular sizes are high (34).

3.5. Solubility

The structure of alveolar and epithelial layer of the mammary gland is mostly formed from lipid. Mammary tissue is very permeable at the beginning of lactation. Therefore, lipophilicity is important in drug transition to milk. Non-ionized, free and lipid-soluble drugs have a better distribution into mammary tissue. In an experimental study, pharmacokinetic behaviours of doramectin and ivermectin have determined in milk and it has been found that C_{max} and AUC values of doramectin in milk are 6 and 4-fold higher than the ivermectin, respectively (37).

3.6. Drug-Drug and Drug-Nutrition Interaction

Xenobiotic and biological substances cause the inhibition or induction of BCRP and also compete for BCRP. Thus, concentrations of BCRP substrates can change in milk. Real et al. (38) have indicated that inhibition of BCRP by ivermectin reduced the concentration of danofloxacin which is BCRP substrate in milk. Similarly, BCRP inhibitors such as albendazole and triclabendazole have caused changes in milk pharmacokinetic parameters of enrofloxacin and moxidectin which are BCRP substrates (11,39). BCRP can also alter transition of xenobiotic and biological substances to milk through drug-nutrition interactions as well as drug-drug interactions. Soybean is widely used as a protein source in animal feed; it contains flavonoids (daidzein and genistein). It has been indicated that daidzein and genistein reduce the secretion of BCRP substrates such as danofloxacin, enrofloxacin and nitrofurantoin to the milk (7,40,41). The concentration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) which is abundantly present in cigarette smoke and well-heated meat has been determined high level in wild type mice milk compared to Bcrp1 -/- mice (6). van Herwaarden et al. (42) have found that milk secretion of riboflavin had reduced >60-fold in Bcrp1 -/- mice compared to in wild-type mice. Also, flavinmononucleotide (FMN) levels have been found 6-fold lower in milk of Bcrp1 -/- mice than wild-type.

But flavin adenine dinucleotide (FAD) levels have been unchanged. In the same study, the concentrations of different vitamins (vitamin A, B₁, B₆, B₉, B₁₂, C, E, H, K₁) in milk have been investigated in Bcrp1 -/- mice and the level of biotin (vitamin H) has been found 3-fold lower in Bcrp1 -/- mice. Carcinogenic and mutagenic chemicals such as heterocyclic amines 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ), 3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indole (Trp-P-1) and aflatoxin B₁ pass into the milk easily. Milk/plasma ratios of these compounds have found 3.4, 2.6 and 3.8-fold higher in wild type mice than Bcrp1 -/- mice, respectively (13). PCB 126 is a dioxin-like PCB which may contaminate milk and dairy products and is also known human carcinogen. Manzini et al. (43) have found that PCB 126 increases bABCG2-mediated excretion of Hoechst H33342 in Madin-Darby canine kidney-bovine ABCG2 (MDCKII-bABCG2) cells line. Also, in the same study the incubation of PCB126-pretreated cells with AFM1 has been found to reverse effect of PCB 126 on bABCG2 efflux activity. Manzini et al. (43) have stated that AFM1 is as likely a substrate of bABCG2. The fumitremorgin C (FTC) and equol known as ABCG2 inhibitor have been found to cause a significant reduction in PhIP transport in MDCKII-bABCG2 and cABCG2 cells (44). On the other hand, only equol has been reported to cause a significant reduction in transition of enrofloxacin in bABCG2 as well as in cABCG2 cells. Also, FTC and equol have been decreased efflux rate of sodium salicylate in MDCKII-bABCG2 cells, but are not decreased in MDCKII-cABCG2 cells. Mahnke et al. (45) have found that the transport of monopteral sulfon (MNPSO₂), which is a metabolite of monopteral known as bovine ABCG2 (bABCG2) substrate, has been significantly inhibited by FTC, enrofloxacin, oxfendazole and moxidectin in bABCG2 cells compared to untreated MDCKII bABCG2 cells. Clinical effectiveness in treatment of mastitis cases can be enhanced by the use of BCRP substrate drugs. At the same time, the addition of BCRP inhibitor to feeds can provide economic contribution by reducing passage of the drugs and toxins into milk.

CONCLUSION

The transition of drugs and substances with carcinogenic properties such as environmental pollutants and mycotoxins (aflatoxins) to milk cause an important health problems and economic losses. The residue problem in animal foods is a global problem with incremental predication. In recent years researchers have shown that not only passive diffusion but active transport and specific transmembrane proteins are involved in the transition of drugs to the milk. The pregnancy and lactation period cause significant changes in the pharmacokinetics of drugs. In particular, it can be stated that diseases such as mastitis cause differences in drug concentration in the milk. It can be useful to investigate the effects of pregnancy and lactation on transition of drug to milk in all species and whether the other diseases affecting milk yield except mastitis may affect the behaviour of the drug in the milk. Milk composition, which varies according to species and breeds, may also affect drug behaviour in milk. There is a BCRP-mediated interaction, which can lead to change concentrations of substances in milk, among xenobiotics, biological substances and nutrients. Clinical efficacy can be improved by combining BCRP substrate drugs used in the treatment of mastitis with a related transmembrane protein inducing compound. The addition of BCRP inhibitor to feeds can minimize the passage of the xenobiotics in order to control the residual levels.

REFERENCES

1. Cheah Y., Kuhn RJ., 1995. Active transport of cimetidine into human milk. *Clin Pharmacol Ther*, 58, 548-555.
2. Gerk PM., Kuhn RJ., Desai NS., McNamara PJ., 2001. Active transport of nitrofurantoin into human milk. *Pharmacotherapy*, 21, 669-675.
3. Schadewinkel-Scherkl AM., Rasmussen F., Merck CC., Nielsen P., Frey HH., 1993. Active Transport of Benzylpenicillin Across the Blood-Milk Barrier. *Pharmacol Toxicol*, 73, 14-19.

4. Gerk PM., Hanson L., Neville MC., McNamara PJ., 2002. Sodium dependence of nitrofurantoin active transport across mammary epithelia and effects of dipyridamole, nucleosides, and nucleobases. *Pharmacol Res*, 19, 299-305.
5. Ito S., Alcorn J., 2003. Xenobiotic transporter expression and function in the human mammary gland. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 653-665.
6. Jonker JW., Merino G., Musters S., van Herwaarden AE., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale TC., Schinkel AF., 2005. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. *Nat Med*, 11,127-129.
7. Pulido MM., Molina AJ., Merino G., Mendoza G., Prieto JG., Alvarez AI., 2006. Interaction of enrofloxacin with breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): influence of flavonoids and role in milk secretion in sheep. *J Vet Pharmacol Ther*, 29, 279-287.
8. Otero JA., Real R., de la Fuente A., Prieto JG., Marques M., Alvarez AI., Merino G., 2013. The bovine ATP-binding cassette transporter ABCG2 Tyr581Ser single-nucleotide polymorphism increases milk secretion of the fluoroquinolone danofloxacin. *Drug Metab Dispos*, 41, 546-549.
9. Otero J., Miguel V., Gonzalez-Lobato L., Garcia-Villalba R., Espin J., Prieto JG., Merino G., Alvarez AI., 2016. Effect of bovine ABCG2 polymorphism Y581S SNP on secretion into milk of enterolactone, riboflavin and uric acid. *Animal*, 10, 238-247.
10. Weikard R., Widmann P., Buitkamp J., Emmerling R., Kuehn C., 2012. Revisiting the quantitative trait loci for milk production traits on BTA6. *Anim Genet*, 43, 318-323.
11. Barrera B., Gonzalez-Lobato L., Otero JA., Real R., Prieto JG., Alvarez AI., Merino G., 2013. Effects of triclabendazole on secretion of danofloxacin and moxidectin into the milk of sheep: Role of triclabendazole metabolites as inhibitors of the ruminant ABCG2 transporter. *Vet J*, 198, 429-436.
12. Otero J., Garcia-Mateos D., de la Fuente A., Prieto J., Alvarez A., Merino G., 2016. Effect of bovine ABCG2 Y581S polymorphism on concentrations in milk of enrofloxacin and its active metabolite ciprofloxacin. *J Dairy Sci*, 99, 5731-5738.
13. van Herwaarden AE., Schinkel AH., 2006. The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins. *Trends Pharmacol Sci*, 27, 10-16.
14. Traş B., 2016. Kedi ve Köpeklerde Davranış Bozuklukları. 2nd ed., 359, Olgun-Çelik Ofset Matbaa Ltd Sti., Konya.
15. Karapehlivan M., Atakisi E., Atakisi O., Yuçayurt R., Pancarci S., 2007. Blood biochemical parameters during the lactation and dry period in Tuj ewes. *Small Ruminant Res*, 73, 267-271.
16. Santschi E., Papich M., 2000. Pharmacokinetics of gentamicin in mares in late pregnancy and early lactation. *J Vet Pharmacol Ther*, 23, 359-363.
17. Ambros L., Montoya L., Kreil V., Waxman S., Albarells G., Reuelto M., Hallu R., San Andres MI., 2007. Pharmacokinetics of erythromycin in nonlactating and lactating goats after intravenous and intramuscular administration. *J Vet Pharmacol Ther*, 30, 80-85.
18. Carceles C., Diaz M., Vicente M., Sutra J., Alvinerie M., Escudero E., 2001. Milk kinetics of moxidectin and doramectin in goats. *Res Vet Sci*, 70, 227-231.
19. Imperiale FA., Mottier L., Sallovitz JM., Lifschitz AL., Lanusse CE., 2003. Disposition of doramectin milk residues in lactating dairy sheep. *J Agric Food Chem*, 51, 3185-3190.
20. Shem-Tov M., Ziv G., Glickman A., Saran A., 1997. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of ewes. *Vet Res*, 28, 571-580.
21. Shem-Tov M., Rav-Hon O., Ziv G., Lavi E., Glickman A., Saran A., 1998. Pharmacokinetics and penetration of danofloxacin from the blood into the milk of cows. *J Vet Pharmacol Ther*, 21, 209-213.
22. Gehring R., Smith G., 2006. An overview of factors affecting the disposition of intramammary preparations used to treat bovine mastitis. *J Vet Pharmacol Ther*, 29, 237-241.

23. Mestorino N., Errecalde JO., 2012. Pharmacokinetic-pharmacodynamic considerations for bovine mastitis treatment. *A Bird's Eye View of Veterinary Medicine*, 22, 423-472.
24. Burmanczuk A., Rolinski Z., Kowalski C., Zan R., 2011. Concentration of cefacetril in milk after its intramammary administration to cows with healthy and inflamed mammary gland. *Bull Vet Inst Pulawy*, 55, 685-658.
25. Sezgin A., Tras B., 2016. Effects of mastitis on pharmacokinetics of elimination with milk of benzimidazole anthelmintics. *Br J Pharmacol Toxicol*, 7, 31-35.
26. Kissell LW., Leavens TL., Baynes RE., Riviere JE., Smith GW., 2015. Comparison of pharmacokinetics and milk elimination of flunixin in healthy cows and cows with mastitis. *J Am Vet Med Assoc*, 246, 118-125.
27. Gips M., Soback S., 1999. Norfloxacin pharmacokinetics in lactating cows with sub-clinical and clinical mastitis. *J Vet Pharmacol Ther*, 22, 202-208.
28. Yagdiran Y., Tallkvist J., Artursson K., Oskarsson A., 2016. Staphylococcus aureus and lipopolysaccharide modulate gene expressions of drug transporters in mouse mammary epithelial cells correlation to inflammatory biomarkers. *PloS One*, 11, e0161346.
29. Oskarsson A., Yagdiran Y., Nazemi S., Tallkvist J., Knight C., 2017. Short communication: Staphylococcus aureus infection modulates expression of drug transporters and inflammatory biomarkers in mouse mammary gland. *J Dairy Sci*, 100, 1-6.
30. Kumar S., Srivastava AK., Dumka V., Kumar N., Raina RK., 2010. Plasma pharmacokinetics and milk levels of ceftriaxone following single intravenous administration in healthy and endometritic cows. *Vet Res Commun*, 34, 503-510.
31. Martinez M., Modric S., 2010. Patient variation in veterinary medicine: part I. Influence of altered physiological states. *J Vet Pharmacol Ther*, 33, 213-226.
32. Merino G., Perez M., Real R., Egido E., Prieto JG., Alvarez AI., 2010. In vivo inhibition of BCRP/ABCG2 mediated transport of nitrofurantoin by the isoflavones genistein and daidzein: A comparative study in Bcrp1-/- Mice. *Pharm Res*, 27, 2098-2105.
33. Elmas M., Tras B., Bas A., Nizamlioglu F., Colak M., Yapar K., 1999. Disposition and milk levels of sulfadiazine-trimethoprim combination following intrauterine bolus administration in lactating cows during postpartum. *Revue Med Vet*, 150, 891-894.
34. Agatonovic-Kustrin S., Ling L., Tham S., Alany R., 2002. Molecular descriptors that influence the amount of drugs transfer into human breast milk. *J Pharm Biomed Anal*, 29, 103-119.
35. Tras B., Bas AL., Dinc DA., 1994. A pharmacodynamic study on the ion-trapping phenomena in udder tissues of cows. *Turk J Vet Anim Sci*, 18, 157-159.
36. Sisodia C., Stowe C., 1964. The mechanism of drug secretion into bovine milk. *Ann N Y Acad Sci*, 111, 650-661.
37. Antonic J., Grabnar I., Milcinski L., Skibin A., Süssinger A., Pogacnik M., Cerkvencik-Flajs V., 2011. Influence of P-glycoprotein inhibition on secretion of ivermectin and doramectin by milk in lactating sheep. *Vet Parasitol*, 179, 159-166.
38. Real R., Egido E., Perez M., Gonzalez-Lobato L., Barrera B., Prieto JG., Alvarez AI., Merino G., 2011. Involvement of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in the secretion of danofloxacin into milk: interaction with ivermectin. *J Vet Pharmacol Ther*, 34, 313-321.
39. El-Sooud KA., 2003. Influence of albendazole on the disposition kinetics and milk antimicrobial equivalent activity of enrofloxacin in lactating goats. *Pharmacol Res*, 48, 389-395.
40. Perez M., Real R., Mendoza G., Merino G., Prieto J., Alvarez A., 2009. Milk secretion of nitrofurantoin, as a specific BCRP/ABCG2 substrate, in assaf sheep: modulation by isoflavones. *J Vet Pharmacol Ther*, 32, 498-502.

41. Perez M., Otero JA., Barrera B., Prieto JG., Merino G., Alvarez Al., 2013. Inhibition of ABCG2/BCRP transporter by soy isoflavones genistein and daidzein: effect on plasma and milk levels of danofloxacin in sheep. *Vet J*, 196, 203-208.
42. van Herwaarden AE., Wagenaar E., Merino G., Jonker JW., Rosing H., Beijnen JH., Schinkel AH., 2007. Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol Cell Biol*, 27, 1247-1253.
43. Manzini L., Halwachs S., Girolami F., Badino P., Honscha W., Nebbia C., 2017. Interaction of mammary bovine ABCG2 with AFB1 and its metabolites and regulation by PCB 126 in a MDCKII in vitro model. *J Vet Pharmacol Ther*, 40, 591-598.
44. Wassermann L., Halwachs S., Baumann D., Schaefer I., Seibel P., Honscha W., 2013. Assessment of ABCG2-mediated transport of xenobiotics across the blood–milk barrier of dairy animals using a new MDCKII in vitro model. *Arch Toxicol*, 87, 1671-1682.
45. Mahnke H., Ballent M., Baumann S., Imperiale F., von Bergen M., Lanusse C., Lifschitz AL., Honscha W., Halwachs S., 2016. The ABCG2 efflux transporter in the mammary gland mediates veterinary drug secretion across the blood-milk barrier into milk of dairy cows. *Drug Metab Dispos*, 44, 700-708.



Florun Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres ile İlişkileri

Efe KURTDEDE¹, Mert PEKCAN¹, Hilal KARAGÜL¹✉

1. Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
06.07.2017	06.12.2017	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Kurtdeede E, Pekcan M, Karagül H: Florun Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres ile İlişkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 373-379, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.326899

Öz: Flor halojen ailesinin bir üyesi olup elektronegatifliği yüksek bir elementtir. Florun organizmaya ve hücre içerisine girişiyle süper oksit üretimi artar. Bunun sonucunda ortaya çıkan hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikalleri florun reaktif oksijen türleri (ROS) ile ilişkisinde belirleyici rol oynar. ROS'daki artış lipid, protein ve DNA moleküllerinde yıkımlanmaya sebep olur. Florid ile temas sonucunda vücutta stres cevabı faktörlerinde, sinyal transdüksiyon bileşiklerinde, ve apoptozis ile ilişkili proteinleri kodlayan gen ekspresyon düzeylerinde artış ortaya çıkar. Florun hücresel düzeydeki bu etkilerinin değerlendirilmesi, Türkiye'de var olan florozis sorununa yeni çözüm önerilebilmesi açısından önem arz etmektedir. Ülkemizde, bugüne kadar yapılan çalışmalarda Muğla, Eskişehir, Kırşehir, Çorum, Ankara, Konya, Hatay, Van ve Ağrı illerinde su, toprak, bitki, koyun idrarı, diş ve kemik örneklerinde flor düzeyleri belirlenmiş ve flor zehirlenmesi hakkında değerlendirmeler yapılmıştır. Bu kapsamda flor'un canlı organizmadaki etkisine hücresel düzeyde değinilerek flor'un serbest radikaller, ROS ve oksidatif stres oluşumuna etkisi değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Flor, Oksidatif Stres, ROS, Serbest Radikaller.

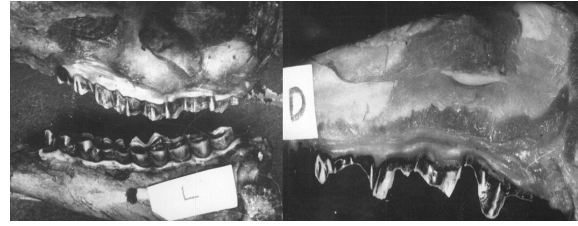
Free Radicals, Reactive Oxygen Species and Relationship with Oxidative Stress

Abstract: Fluorine is a highly reactive chemical element and a member of halogen family. Fluorides entry into the organism and cells that increases the production of superoxide. Superoxide generates hydrogen peroxide, peroxyxynitrite, and hydroxyl radicals, and plays a decisive role at the relationship between fluorine and reactive oxygen species (ROS). The increase in ROS causes oxidative damage in lipid, protein, and DNA molecules. As a result of contact with fluoride, an increase in gene expression levels encoding stress related response factors in the body, signal transduction compounds, and apoptosis related proteins occurs. Assessment of these effects at the cellular level of fluor is important in terms of suggesting a new solution to the problem of fluorosis in Turkey. Fluoride levels were determined in water, soil, plant and sheep urine, tooth, bone samples in the areas of Ağrı, Van, Muğla, Eskişehir, Kırşehir, Çorum, Ankara, Hatay in Turkey. Results were evaluated to find out fluor toxicosis. In this review, the effect of fluoride in the living organism is addressed at cellular level, and the effect of fluoride on free radicals, ROS and oxidative stress formation is discussed.

Keywords: Fluoride, Free Radicals, Oxidative Stress, ROS.

GİRİŞ

Flor, ülkemizde başta Doğu Anadolu bölgesi olmak üzere bazı yörelerde doğal olarak bol miktarda bulunmakta, endüstriyel ürünlerde çeşitli konsantrasyonlarda kullanılmakta ve çevre kirliliğine bağlı olarak yoğun flor kontaminasyonları gerçekleşmektedir. Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmalarda Şendil ve Bayşu (1), volkanik bölgeler olan Van/Çaldıran ve Ağrı/Doğubeyazıt'da değişik köylerden alınan su örneklerindeki flor miktarlarını 5.70-15.20 mg/l, florozis belirtileri olan koyun idrar örneklerindeki flor düzeylerini 3.80-30.61 mg/l olarak belirlemiştir. Ergun ve ark (2), Van/Ağrı yöresinde flor miktarını kaynak sularında ortalama 7.67 mg/l, toprak örneğinde ortalama 17.4 mg/kg, bitki örneğinde 15.24 mg/kg, diş örneği külünde 3787-5299 mg/kg, kemik örneği külünde 3374-5149 mg/kg, koyun idrarında ortalama 8.11 mg/l olarak belirlemiştir. Fidancı ve ark. (3), doğal flor kontaminasyonunun koyunlarda florozise yol açtığını gösteren araştırmalar yapmışlar, Eskişehir/Kızılcaören, Kırşehir-Kaman/Bayındır, Akçakent/Yeniyapan ve Çiçekdağ/Pöhrək'ten sağladıkları su, toprak, bitki ve koyun idrar örneklerindeki flor değerlerinin kontrol değerlerine göre yüksek olduğunu belirlemiştir. Altıntaş ve ark. (4), doğada flor konsantrasyonunun yüksek olduğu Eskişehir/Kızılcaören köyü ve Van/Çaldıran'da merada yayılan koyunların idrarındaki flor miktarlarını sırasıyla ortalama 5.33 ve 8.13 ppm bulmuşlardır. Işıklı ve ark. (5), Eskişehir ili Kızılcaören ilçesinde flor madeni bölgesinde su flor miktarını 3,9 mg/l olduğuna işaret etmişlerdir. Erdoğan (6), Hatay yöresindeki içme suyu örneklerinde flor düzeyini 0.140-0.751 ppm, Erzin bölgesinde kaynak suyunda 2.140 ppm olarak ölçmüşlerdir. Öksüz (7), Kırşehir/Pöhrək'te su flor düzeyini sıcak su kaynaklarında 5.5-5.7 mg/l, çeşme sularında 0.63-2.6 mg/l, artezyen kuyu suyunda 0.63 mg/l bulmuştur. Doğal ve endüstriyel flor kirliliğine bağlı olarak sığırlarda ve koyunlarda kronik flor zehirlenmesi bulguları ortaya konulmuştur. Son yıllarda ise florun hücre ve enzim sistemleri üzerine etkisi üzerine çalışmalar yapılmıştır (8).



Şekil 1. Türkiyede Doğu Anadolu bölgesinde florozis görülen koyunlarda mandibula ve maksilla yapısındaki değişimler ve dişde beneklenme, lekelenmeler ve aşınmalar (2).

Figure 1. Fluorosis in eastern Anatolia in Turkey mandible and maxilla structure and changes in the tooth, mottling, staining and abrasions (2).

Vücuda solunum ve sindirim yoluyla giren flor, sistemik olarak ve hücre düzeyinde akut ve kronik yıkımlanmalara yol açar (8).

Bu derlemenin amacı, florun canlı organizmadaki etkisine hücresel düzeyde değinilerek ve florun serbest radikaller, reaktif oksijen türleri ve oksidatif stres oluşumu ve ilişkileri ile ilgili güncel bilimsel verilerin değerlendirilmesidir.

1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller hücrelerde oksijen türlerinden (ROS) veya nitrojenden reaktif nitrojen türlerinden (RNS) köken alırlar. Farklı fiziksel ve kimyasal uyarılara ve organizmada gelişen çeşitli dejeneratif durumlara karşı düşük veya orta miktarlarda üretilen serbest radikaller, hücrelerin sinyal gönderici ve savunma mekanizmalarında merkezi rol alırlar. Fazla miktarda üretilen veya normal miktarda üretildiği halde doğal olarak nötralize edilemeyen serbest radikaller lipidlerde peroksidasyona, proteinlerde yıkıma bağlı enzim aktivitesi kaybına ve DNA yıkımı sonucu mutagenезis ve karsinogenezise yol açar (9,10). Bazı serbest radikaller nitrik oksit radikal (NO[•]), süperoksid iyon radikal (O₂^{-•}), hidroksil radikal (OH[•]), alkoksil radikal (RO[•]), nitrojen dioksit (NO₂[•]), peroksil (ROO[•]), lipid peroksil (LOO[•]), ozon (O₃), hipoklorik asit (HOCl), nitöz asit (HNO₂), peroksinitrit (ONOO[•]), dinitro trioksit

(N₂O₃), lipid peroksit (LOOH), hidrojen peroksit (H₂O₂), singlet oksijen (¹O₂)'dir.

Günümüzde yaşamın kaçınılması en zor ve en önemli sorunları olan çevre, gıda ve su kaynaklarının kirliliği, beslenme bozuklukları ve stres vücutta serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır. Bunların metabolize edilişleri ve nötralizasyonunu aksamaktadır. Sonuçta organizmada çeşitli dejeneratif bozukluklar oluşurken enfeksiyöz etkenlerle mücadelede yetersizlikler ortaya çıkar. Son yirmi yılda çeşitli dokularda görülen dejeneratif bozukluklar ve kanser olgularındaki artışta serbest radikallerin rolü kolorimetrik, florimetrik, kemilüminisans yöntemleriyle yoğun şekilde araştırılmakta ve söz konusu bozuklukların önlenmesinde radikal antagonistleri olan antioksidanların kullanılması konusunda geniş çaplı çalışmalar yapılmaktadır. Son yıllarda serbest radikallerin biyokimyasal reaksiyonlardaki rollerinin önemleri de anlaşılmış, hastalık durumlarında organizmada serbest radikallerin çeşit ve miktarlarında artış dikkati çekmiştir (9,11,12).

2. ROS

Normal metabolik süreçte belirli düzeyde ROS oluşur. Vücuda giren hastalık etmenlerine karşı bazı lökosit hücreleri de normalin dışında ROS'un açığa çıkmasına yol açar. Organizmada metabolizma esnasında oluşan belirli miktardaki ROS, yıpranmış hücrelerin yıkılmasını işlevinde görev alır. Vücutta üretilen ROS'un sağlıklı hücrelerde de yıkılayıcı etkiye yol açmaması için endojen (Süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidad (GSH-Px), glutasyon S-Transferaz (GST), katalaz (CAT), melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, gibi) ve eksojen (α-tokoferol (vitamin E), β-karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat) gibi) antioksidanlar görev yapar (13).

3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres, organizmada metabolik süreçte ortaya çıkan serbest radikaller ve reaktif metabolitler ile antioksidatif sistem arasındaki dengesizlik olarak tanımlanır. Oksidatif ve antioksidatif süreçler, hücre ve organizmalarda redoks durumunu etkileyen elektron transferleri ile birlikte ortaya çıkar. Redoks durumundaki bu değişiklikler birçok proteinin

aktivitesini artırarak ya da durdurarak hücrelerin akıbetini belirleyen sinyal yollarını harekete geçirir. Oksidatif stres, oksidatif ve antioksidatif denge bozukluğunun derecesine ve etkilenen hücrelerin özelliklerine bağlı olarak hücrelerde yangı, apoptozis veya proliferasyon ve malignant reaksiyon gibi olaylar meydana gelir. Bunun sonucunda etkene ve organizmanın savunma sisteminin gücüne bağlı olarak çeşitli dokularda bozukluklar ortaya çıkar (13).

Oksidatif stres kronik ve dejeneratif bozuklukların (kanser, artrit, yaşlanma, otoimmün bozukluklar, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar) önemli nedenidir. Vücut oksidatif strese karşı koyabilmek için antioksidanları üreterek birçok mekanizmayı devreye sokar. Antioksidanlar vücutta üretilebildiği gibi (endojen), gıdayla veya gıda katkısı (eksojen) olarak dışardan da alınabilir. Antioksidanlar serbest radikal süpürücüleri olarak isimlendirilir. Bunlar ROS ve RNS tarafından oluşturulan yıkımı önler veya tamir ederken, immün mekanizmayı güçlendirir kanser ve dejeneratif hastalık riskini düşürür (14).

Oksidatif stres durumunda hidroksil radikal ve peroksinitrit aşırı üretildiğinde hücre zarı ve lipoproteinler lipid peroksidasyonu yoluyla yıkımlanır. Bu reaksiyon malondialdehit (MDA)'in ve konjege olmuş dien bileşiklerin (sitotoksik ve mutajenik maddeler) şekillenmesine yol açar (15).

DNA'nın oksidatif yıkılması, farklı DNA yıkılmalara ve mutasyonlara yol açar. Organizma DNA'yı etkileyen bu ataklara karşı koymak için DNA'yı tamir eden enzimleri ve/veya antioksidanları kullanan birçok mekanizmaya sahiptir (16,17,18).

Oksidatif stres, uygun şekilde idare edilmediği takdirde yaşlanma, bazı akut patolojiler (travma, felç) ile değişik kronik ve dejeneratif hastalıkların ortaya çıkışını başlatabilir (19,20).

4. Floridler ile ROS İlişkisi

Floridlerle temas sonucu süper oksit üretiminin artmasıyla ortaya çıkan hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikalleri florun ROS ile ilişkisinde belirleyici rol oynar (20). Floridlerle temas edilmesiyle süper oksit üretimi artar, takiben oluşan hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikalleri florun ROS ile ilişkisinde belirleyici rol oynar (21).

Flor intoksikasyonundan sonra ROS ve nitrojen oksit (NO) düzeyleri de önemli ölçüde artar. Floridlerin neden olduğu NO üretimi artışı sonucu NO ile süper oksit reaksiyona girerek peroksinitrit ve proteinlerdeki tioller oluşur (22,23). Peroksinitrit ile metal merkezleri reaksiyona girdiğinde nitrozil eklentileri meydana gelir. NO disülfid bağı oluşumunu engelliyerek endoplazmik retikulumda hatalı katlanmış proteinlerin birikmesine yol açar (8). Antioksidanların hücreleri florla temas sonucu ortaya çıkacak lipid peroksidasyonundan yoğun şekilde koruması (22,24) florun etkisini oksidatif nitrozatif yıkımı üzerinden yaptığını göstermiştir (8).

Florun mitokondri üzerindeki toksik etkisi ROS indüksiyonuna ve antioksidan savunmada zayıflamaya yol açar. Aşırı ROS üretimi lipid peroksidasyonu, mitokondriyal membran depolarizasyonu ve apoptozisin ortaya çıkmasına neden olur (8). ROS oluşumunun artışı hem apoptozis hem de nekrozise işaret eder. Hücre ölümünün tipi ve hücrelerde oluşan ROS'un özellikleri florid iyonunun miktarıyla ilişkilidir. Ratlarda oluşturulan florid toksikasyonunda ROS'daki artışın ağız mukoza hücreleri ve hepatositlerde apoptozis ve hücre siklusu değişikliklerine yol açtığı belirtilmiştir (25). İçme sularına fazla miktarda florid katılan ratların kan, karaciğer, böbrek ve beyinde aşırı ROS üretiminin meydana geldiği gösterilmiştir (26,27,28,29,30). Yüksek dozda florid verilen fare spermetazoalarında ROS oluşumunun artışı ile morfolojik anormalliklerin birlikte ortaya çıktığı gözlenmiştir (31).

Rat spermatozoasının florid etkileşmesi ile NADPH oksidaz (ROS oluşumuna katılan diğer bir enzim) aktivitesinin arttığı gösterilmiştir (21). Doku yıkımının bir göstergesi olan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivite artışı diyetinde yüksek miktarda florid bulunan ratlarda belirlenmiştir (32). Diyetinde yüksek miktarda florid bulunan ratlarda, doku yıkımının bir göstergesi olan laktat dehidrogenaz (LDH) aktivitesinin artışı belirlenmiştir (32,33). Florid tarafından etkilenen diğer hücresel bileşikler transaminazlar (AST ve ALT), kreatin kinaz (CK), total lipidler (TLs), kolesterol, trigliseridler (TGs) ve düşük dansiteli lipoprotein-kolesteroller (LDL-c) olup bunların miktarının yine florid verilen ratlarda arttığı belirlenmiştir (22). İçme suyuna florid katılan ratların

eritrositlerinde 'HEM mekanizması' (Hemoglobin) sentezi ile ilgili parametrelerde inhibisyon geliştiği ve bu bozukluğun beyindeki tüm biyogenik amin düzeylerindeki azalma ile birlikte ortaya çıktığı gösterilmiştir (28).

Floridlerin süper oksit dismutaz (SOD), glutasyon peroksidaz ve katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği düşünülmektedir (21,34,35). Ayrıca flor glutasyon düzeyinde değişiklik yaparak mitokondrielerde ROS üretimini artırır ve sonuçta selüler yapılarda yıkım şekillenir (34,36). Floridler strese cevap olarak ortaya çıkan yapıları örneğin MAP (mitogen activated protein) kinazı aktive eder ve sinyalle regüle edilen protein kinaz (ERK)'ın aktivasyonu gerçekleştirir (37,38,39).

5. Floridler ile Oksidatif Stres İlişkisi

Endemik florozisli alanlarda yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda floridlerin neden olduğu apoptozise işaret eden lipid peroksidasyonu ve ROS üretimi tanımlanmıştır (8,40).

Oksidatif stresin hücre ölümüne neden oluşu genellikle lipid peroksidasyonu (LPO) birlikte gelişir. Lipid peroksidasyonu hücre ve dokularda florla oluşturulan sitotoksinin önemli bir mekanizmasıdır. LPO durumu lipid peroksidasyonunun yan ürünleri olan MDA'nın (malondialdehit) belirlenmesiyle ortaya konulabilir (41). Endemik florozisli bölgelerde yaşayan çocuk ve erişkinlerin eritrositlerinde önemli LPO' u rapor edilmiştir (42).

GSH azalması genel olarak hücreler içindeki prooksidan ve antioksidan aktiviteler arasındaki dengesizliğe ve mitokondriyalardaki aşırı ROS üretimine bağlanmakta ve bu olaylar hücrelerde yıkıma yol açmaktadır. Hücrelerde NaF ile oluşturulan apoptozis GSH'ın serum düzeyinde düşüş ile birlikte ortaya çıkar. Hücrelerde nekrozun gelişmesi durumunda GSH taşıyıcılarının süpresyonu sonucu GSH düzeyinde artış şekillenir (41).

6. Floridler ile Antioksidan Enzim Aktivitesi İlişkisi

Floridlerin hücre antioksidatif mekanizmasında ve serbest radikallerin eliminasyonunda rol oynayan SOD, GSH-Px ve CAT gibi enzimlerin aktivitesini değiştirdiği bildirilmiştir (41). Endemik florozisin görüldüğü bölgelerde yaşayan insanların kanında

serbest radikal süpürücülerinden olan SOD, GST, CAT ve GSH-Px gibi enzimlerin aktivitesinde düşüş saptanmıştır (23,36). Yüksek miktarda florid verilen rat ve fare eritrositlerinde SOD aktivitesinde uzun dönemde önemli düşüş ortaya çıkmıştır (36,43). Deney hayvanlarına NaF verilmesi karaciğerde (38), böbreklerde (38) ve beyinde (32) SOD, GST, CAT ve GSH-Px enzim aktivitesinde düşüşe neden olmuştur. Düşük dozda NaF verilen farelerin osteoblastlarında SOD, GST, CAT ve GSH-Px gibi enzimlerin aktivitesinde gözlenen artış floridin kemik hücrelerine olumlu etkisi olarak düşünülmüştür. Yüksek doz florid verilenlerde ise bu enzimlerin aktivitesinde önemli derecede supresyon azalma ortaya çıkmıştır (44,45).

SONUÇ

Flor elektronegatifliği yüksek bir elemnettir. Floridlerin vücutta oluşturduğu biyokimyasal ve sellüler etkiler hücre içerisinde ve organizmaya girişini takiben süper oksit üretiminin normal seviyesinin üstüne çıkmasıyla sonuçlanır. Süper oksit molekülü, hidrojen peroksit, peroksinitrit ve hidroksil radikallerinin fazla miktarda ortaya çıkışına sebep olur. Bu durumda, hücresel düzeyde lipid, protein ve DNA moleküllerinde yıkımlanmalarına meydana gelir. Floridlerle temas sonucu stres cevabı faktörleri, sinyal transdüksiyon bileşikler ve apoptozis ilişkili proteinleri kodlayan gen ekspresyon düzeylerinde artış ortaya çıkar. Son yıllarda üzerinde önemle durulan florun hücresel düzeydeki etkileri ve oksidatif stres mekanizmaları üzerine etkisinin değerlendirildiği bu derlemede etki mekanizmaları üzerinde değerlendirmeler yapılmıştır.

KAYNAKLAR

- Şendil Ç., Bayşu N., 1973. İnsan ve hayvanlardaki Ağrı İli Doğubayazıt ilçesi köylerinde görülen flor zehirlenmesi ve bunun van ili muradiye ilçesi köylerinde de saptamamızla ilgili ilk tebliğ.
- Ergun HS., Rüssel-Sinn HA., Baysu N., Dündar Y., 1987. Studies on the fluoride contents in water and soil, urine, bone and teeth of sheep, and urine of human from eastern and western parts of Turkey. *Dtsch. Tierarstl Wschr*, 94, 381-440.
- Fidancı UR., Salmanoğlu B., Maraşlı Ş., Maraşlı N., 1998. İç Anadolu Bölgesinde doğal ve endüstriyel florozis ve bunun hayvan sağlığı üzerine etkileri. *Tr Vet Anim Sci*, 22, 537-544.
- Altıntaş A., Fidancı UR., Sel T., Duru Ö., Başsatan A., 2000. Doğal ve endüstriyel florozisli koyunlarda böbrek fonksiyonu ve serum protein elektroforezi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 47, 105-114.
- Işık B., Kalyoncu C., Metintaş S., Demir TA., 2000. Eskişehir yöresindeki içme sularında florür düzeyleri. *Ekoloji Çevre Dergisi*, 9, 36, 28-30.
- Erdoğan S., 2002. Hatay bölgesi içme suyu örneklerinde flor düzeyleri. *Vet Bil Derg*, 18, 1-2.
- Öksüz S., 2006. Pöhrenk (Kırşehir) sıcak su kaynaklarının hidrojeokimyasal incelemesi. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Barbier O., Arreolar-Mendoza L., Del Roza LM., 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem-Biol Interact*, 188, 319-333.
- Sivanandham V., 2011. Free radicals in the health and disease a mini review. *Pharmacologyonline*, 1, 1062-1077.
- Ozcan O., Erdal H., Cakırca G., Yönden Z., 2015. Oksidatif stres ve hücre içi lipid, protein ve DNA yapıları üzerine etkileri. *J Clin Exp Invest*, 6, 331-336.
- Jha JC., Banal C., Chow BSM., Cooper ME., Karin JD., 2016. Diabetes and Kidney Disease: Role of Oxidative Stress. *Antioxid Redox Signal*, 12, 657-684.
- Pisoschi AM., Negulescu GP., 2011. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*, 1, 1-10.
- Durackova Z., 2010. Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*, 59, 459-469.
- Chatterjee M., Saluja R., Kanneganti S., Chinta S., Dikshit M., 2007. Biochemical and molecular evaluation of neutrophil nos in spontaneously hypersensitive rats. *Cell Mol Biol*, 53, 84-93.
- Ayala A., Mario F., Munoz F., Arguelles S., 2014. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*, 31.
- Genestra M., 2007. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signa*, 19, 1807-1819.
- Cadet J., Davies KJA., 2017. Oxidative DNA

- damage & repair: An introduction. *Free Radic Biol Med*, 107, 2-12
18. Willcox JK., Ash SL., Catignani GL., 2004. Antioxidants and prevention of chronic disease. Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 44, 275-295.
19. Pham-Huy LA., He H., Pham-Huy CP., 2008. Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int Biomed Sci*, 4, 89-96.
20. Doğan İ., Mert H., İrak K., Mert N., 2016. Investigation of Antioxidant Compounds in Fluorotic Sheep. *Scientific Works. Series C Vet Med*, 2, 23-26.
21. Izquierdo-Vega JA., Sánchez-Gutiérrez M., Del Razo LM., 2008. Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss. *Toxicol. Appl Pharmacol*, 230, 352-357.
22. Hassan HA., Yousef MI., 2009. Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats. *Food Chem Toxicol*, 47, 2332-2337.
23. Sadhukhan P., Saha S., Sil PC., 2016. Anti-Oxidative Effect of Genistein and Mangiferin on Sodium Fluoride Induced Oxidative Insult of Renal Cells: A Comparative Study. *Biomark J*, 2, 1-2.
24. Ke L., Zheng X., Sun Y., Ouyang W., Zhang Z., 2016. Effects of Sodium Fluoride on Lipid Peroxidation and PARP, XBP-1 Expression in PC12 Cell. *Biol Trace Elem Res*, 173, 161-167.
25. He LF., Chen JG., 2006. DNA damage, apoptosis and cell cycle changes induced by fluoride in rat oral mucosal cells and hepatocytes. *World J Gastroenterol*, 12, 1144-1148.
26. Mert H., Comba B., Mert N., Cinar A., Apaydin B., 2016. Advanced oxidation protein products (AOPP) levels and kidney function in fluorotic Sheep. *Fluoride*, 49, 3, 336-342.
27. Chouhan S., Flora JS., 2008. Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data. *Toxicology*, 254, 61-67.
28. Chouhan S., Lomash V., Flora JS., 2010. Fluoride-induced changes in haem biosynthesis pathway, neurological variables and tissue histopathology of rats. *J Applied Toxicology*, 30, 63-73.
29. Yur F., Belge F., Mert N., Yörük I., 2003. Changes in erythrocyte parameters of fluorotic sheep. *Fluoride*, 36, 152-156.
30. Ansar S., Hamed S., Al Ghosoon HT., Al Saedan RA., Iqbal M., 2016. The protective effect of rutin against renal toxicity induced by lead acetate. *Toxin Reviews*, 35, 58-62.
31. Sun Z., Niu R., Wang B., Jiao Z., Wang J., Zhang J., Wang S., Wang J., 2011. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo. *Archives Toxicol*, 85, 1441-1452.
32. Vani ML., Reddy KP., 2000. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*, 33, 17-26.
33. Yur F., Mert N., Dede S., Deger Y., Ertekin A., Mert H., Yasar S., Dogan I., Isik A., 2013. Evaluation of serum lipoprotein and tissue antioxidant levels in sheep with fluorosis. *Fluoride*, 46, 90-96.
34. Garcia-Montalvo EA., Reyes-Perez H., Del Razo LM., 2009. Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress. *Toxicology*, 263, 75-83.
35. Nobes CD., Hall A., 1995. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81, 53-62.
36. Shivarajashankara YM., Shivashankara AR., Gopalakrishna BP., 2001. Rao SH. Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis. *Fluoride*, 34, 108-113.
37. Karube H., Nishitai G., Inageda K., Kurosu H., Matsuoka M., 2009. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells. *J Dent Res*, 88, 461-465.
38. Andrew MK., Keyse SM., 2016. The regulation of oncogenic Ras/ERK signalling by dual-specificity mitogen activated protein kinase phosphatases (MKPs). *Semin Cell Dev Biol*, 50, 125-132.
39. Kumar D., Tewari-Singh N., Agarwal C., Jain AK., Inturi S., Kant R., White CW., Agarwal R., 2015. Nitrogen mustard exposure of murine skin induces DNA damage, oxidative stress and activation of MAPK/Akt-AP1 pathway leading to induction of inflammatory and proteolytic mediators. *Toxicol Lett*, 235, 161-171.

40. Chlubek D., 2003. Fluoride and oxidative stress. *Fluoride*, 36, 217-228.
41. Agalakova NI., Gusev GP., 2012. Molecular mechanisms of cytotoxicity and apoptosis induced by inorganic fluoride. *Cell Biology*, 1-16.
42. Shanthakumari D., Srinivasalu S., Subramanian S., 2004. Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*, 204, 219-228.
43. Sinha M., Manna P., Sil P., 2007. A 43kD protein from the herb, *Cajanus indicus* L., protects against fluoride induced oxidative stress in mice erythrocytes. *Pathophysiology*, 14, 47-54.
44. Xu H., Wang CH., Zhao ZT., Zhang WB., Li GS., 2008. Role of oxidative stress in osteoblasts exposed to sodium fluoride. *Biol Trace Element Res*, 123, 109-115.
45. Meral I., Demir H., Gunduz H., Mert N., Dogan I., 2004. Serum copper, zinc, manganese, and magnesium status of subjects with chronic fluorosis. *Fluoride*, 37, 102-106.



Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri*

Nihat TELLİ¹, Ahmet GÜNER²

1. Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Teknolojisi Programı, Konya, TÜRKİYE.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.07.2017	18.12.2017	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Telli N, Güner A: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 380-388, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.327611

Öz: *Mycobacterium avium* kompleksi üyelerinden olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) çok çeşitli hayvan türlerinde Johne hastalığının (paratüberkülozis) etiyolojik etkenidir. Paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren ve asemptomatik taşıyıcı hayvanlar etkeni süt, dışkı ve spermeleriyle yaymaktadırlar. Süt direkt olarak etkeni taşıyabildiği gibi özellikle dışkı kaynaklı indirekt bulaşmalar da gerçekleşebilmektedir. Sütün yanı sıra peynir, yoğurt, krema, tereyağı, dondurma vb. süt ürünleri de etkeni taşıyabilmektedir. Süt sığırlarındaki Johne hastalığı ile insanlarda görülen Crohn hastalığı insidenslerinde dünya genelinde artış görülmektedir. Yüksek klinik ve patolojik benzerlikler bulunan bu hastalıklar arasındaki olası ilişkide gıdaların rolünün yorumlanmasında ve güvenilir sonuçlar alınmasında MAP'ın süt ve süt ürünlerinde tespit yöntemleri önem arz etmektedir. Bu amaçla süt ve süt ürünlerinde Ziehl-Neelsen boyama, floresan mikroskop, katı faz sitometri ve biyoluminesans gibi direkt tanı ve kültür yöntemleri ile MAP etkenleri araştırılabilmektedir. Bu yöntemlerin yanı sıra radyoimmün testler (RIA), enzim bağlı immün testler (ELISA), agar jel immünodifüzyon testi (AGID) ve komplement fiksasyon testi (CF test) gibi serolojik teknikler ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleik asit hibridizasyonu, immunomagnetic separation PCR, Nested PCR, Real-Time PCR gibi moleküler teknikler veya bu tekniklerin kombinasyonlarıyla hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Crohn hastalığı, Johne hastalığı, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

Detection Methods of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Milk and Milk Products

Abstract: *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) is a member of the *Mycobacterium avium* complex, and is the etiologic agent of Johne's disease (paratuberculosis) in a wide variety of animal species. Animals with clinical signs of paratuberculosis and asymptomatic carriers spread the agent by their milk, feces and sperm. While milk may carry the microorganism, indirect contamination may also be caused by feces. As well as milk, cheese, yoghurt, cream, butter, ice cream and other dairy products can also carry the pathogen. The increase in the incidence of Crohn's disease in humans and Johne's disease in dairy cattle is observed worldwide. The detection methods of MAP in milk and dairy products are important to obtain reliable results in interpreting the role of food and possible relationships between these diseases with their high clinical and pathological similarities. For this purpose, MAP agents can be investigated by classical cultural and direct diagnosis methods such as Ziehl-Neelsen staining, fluorescence microscopy, solid-phase cytometry and bioluminescence in milk and dairy products. In addition to these methods, serological techniques such as radioimmunoassays-RIA, enzyme-linked immunoassays-ELISA, agar gel immunodiffusion assay-AGID and complement fixation-CF test and molecular techniques such as polymerase chain reaction-PCR, nucleic acid hybridization, immunomagnetic separation PCR, Nested PCR, Real-Time PCR or the rapid methods which are the combination of these techniques have also been developed.

Keywords: Crohn's disease, Johne's disease, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

✉ Nihat TELLİ

Konya Teknik Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Gıda Teknolojisi Programı, Konya, TÜRKİYE.
e-posta: nteilli@ktun.edu.tr

*Bu derlemenin özeti "3rd International Vetİstanbul Group Congress 2016" Kongresi (17-20 Mayıs 2016, Saraybosna, Bosna Hersek)'nde poster olarak sunulmuştur.

GİRİŞ

Mycobacteria, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology'de aerobik, spor oluşturmeyen, yavaş gelişen, hareketsiz, çomak şekilli, Gram pozitif ve aside dirençli bakterileri içeren grup olarak tanımlanmaktadır (1). Bu grupta yer alan bakteriler kompleks lipitlerden oluşan hücre duvarı yapılarına sahiptir. Ekzo ve endo toksin üretmezler ancak mikobakteriyel proteinlere karşı gecikmiş tip hipersensitivite reaksiyonlarına neden olurlar. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* ve *Mycobacterium leprae* patojenik türler olmakla birlikte *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium ulcerans* ve *Mycobacterium smegmatis*'de fırsatçı patojen olarak tanımlanmaktadır (2).

Mycobacterium avium kompleksi (MAC) üyelerinden olan *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) (3), başta evcil ve yabani ruminantlar olmak üzere çok çeşitli hayvan türlerinde (örn., köpek, domuz, at, tavuk, primatlar) gastrointestinal sistemini etkileyen Johne hastalığının (paratüberkülozis) etiyolojik etkenidir (4,5).

1. Çiftlik Hayvanlarında *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

MAP etkenleri çiftlik hayvanlarında ilk kez 1895 yılında tanımlanmıştır. Almanya'da Dresden Veteriner Patoloji Enstitüsü'nde Prof. Dr. Johne ve Dr. Frothingham tarafından kronik bağırsak yangılı bir inekte identifikasyonu yapılmıştır (3,6). Etkenin neden olduğu Johne hastalığında, özellikle süt sığırlarında kondisyon kaybı, süt veriminde azalma, kaşeksiye varabilen kilo kaybı ve ishal en tipik klinik belirtilerdir (6). İshal belirtilerinin sığırlara nazaran daha güç tespit edildiği koyun ve keçi gibi küçükbaş hayvanlarda da geniş bir dağılım görülmekte ve bu hayvanlarda enfeksiyon çoğunlukla ölümle sonuçlanmaktadır (5,6). Hastalık; yüksek prevalansı yanında kaşeksi, süt veriminde azalma ve tedavi-kontrol uygulamalarıyla da önemli ekonomik

kayıplara yol açması bakımından önem arz etmektedir (4).

Asemptomatik hayvanların 18 aylık döneme kadar etkeni dışkı ve sütleriyle yaydıkları bilinmektedir. Bu durum sürü sağlığının korunması, hastalığın hayvanlarda teşhisi, kontrol ve eradikasyon problemlerine neden olmaktadır (7). Hastalığın çiftliklerde kontrolü, sürü ve halk sağlığının korunmasında en önemli faktördür (8). Bu amaçla birçok ülkede ulusal programlar geliştirilmiştir. Avustralya Ulusal Sığır Johne Hastalığı Stratejik Planı (NBJDSP), Kanada Johne Hastalığı Birliği (CJDI), Danimarka Paratüberküloz Operasyon Programı (OP), Hollanda Yoğunlaştırılmış Paratüberküloz Programı (IPP), İngiltere Sığır Sağlığı Sertifikasyon Standartları (CHECS) ve Amerika Birleşik Devletleri Gönüllü Sığır Johne Hastalığı Kontrol Programı bunlara örnek olarak verilebilir (9).

2. Crohn Hastalığı ve *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Crohn hastalığı insanların gastrointestinal sisteminin özellikle terminal ileum ve kolon bölgeleri başta olmak üzere ağızdan anüse kadar bütün kısımlarında kronik granümatöz yangılara sebep olmaktadır (6). Kronik ishal, iştahsızlık ve kilo kaybı, ateş ve fibrotik inflamasyonlar genel klinik bulgular olup tanısı zor bir hastalıktır. Hastalığın akut evrelerinde kusma, iştahsızlık ve apandisit bulgularını andıran ishal, kronik olgularda spesifik karakterde olmayan karın ağrıları görülmektedir (10).

Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte çoklu genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimlerinin hastalığa neden olduğu düşünülmektedir (10). Bu konudaki düşünceler; kronik karakterdeki bir enfeksiyona karşı gelişen bir reaksiyon, bağırsak mukozal bariyerinde meydana gelen hasarların bir sonucu ve konakçı bağışıklık sistemi düzensizliğinden kaynaklandığı üzerine yoğunlaşmaktadır (7). Hastalığın etiyolojisinde farklı türde mikroorganizmalar (Tablo 1) olabileceği çeşitli kaynaklarda bildirilmiştir (10,11,12).

Tablo 1. Crohn Hastalığı Etiyolojisinde Yer Alan Muhtemel Mikroorganizmalar (10,11,12).**Table 1.** Possible Microorganisms in the Etiology of Crohn's Disease (10,11,12).

Mikroorganizma Grubu	Etkenler
Bakteriyel	<i>Shigella</i> spp, <i>Salmonella</i> spp, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Escherichia coli</i> EHEC/EAEC, <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Yersinia</i> spp, <i>Actinomyces</i> , <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , atipik <i>Mycobacteria</i> , <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Chlamydia trachomatis</i> , <i>Tropheryma whipplei</i>
Viral	Cytomegalovirus, Herpes Simplex, Human Immunodeficiency Virus, Caliciviridae, Astro-, Adeno- ve Rotavirus
Mikotik	<i>Candida</i> spp, <i>Aspergillus</i> spp
Paraziter	<i>Entamoeba histolytica</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Isospora belli</i> , <i>Cryptospora</i> spp, <i>Trichuris trichiura</i>

MAP etkenlerinin insanlarda da benzer klinik belirtiler gösteren bir hastalığın etiolojisinde rol oynayabileceği iddiası ilk kez 1913 yılında ortaya atılmıştır (3). Bu iddianın temelinde insanlarda da bağırsağın kronik iltihabına neden olan sistemik bir hastalıkla Johne hastalığı arasındaki yüksek klinik ve patolojik bulgu benzerliği yatmaktadır (4,6). Crohn hastalığının patogenezinde MAP'ın potansiyel bir rolü olduğuyla ilgili kanıtlar, genellikle hastalardan etken izolasyonunun yapılabilmesiyle elde edilmektedir (13). Ancak Crohn hastalarından MAP etkenlerinin izolasyonlarındaki güçlükler, sağlıklı ve güvenilir sonuçlar alınması ile ilgili problemler yaratmaktadır. Günümüze kadar bu ilişkilerin açıklanabilmesi amacıyla yapılan kapsamlı genom çalışmalarıyla da net sonuçlar elde edilememiştir (13). MAP'ın insanlarda Crohn hastalığının bazı vakalarından sorumlu olduğu ile ilgili giderek artan sayıda bilimsel veriler olmasına rağmen bu konu halen tartışmalıdır (14).

3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*'in Süt ve Ürünlerindeki Varlığı

Paratüberkülozun klinik belirtilerini gösteren ve asemptomatik taşıyıcı hayvanlar etkeni süt, dışkı ve spermeleriyle yaymaktadır. Etkenler bu dokularda uzun süre canlılıklarını sürdürebilmektedir (15,16). Süt direkt olarak etkeni taşıyabildiği gibi özellikle dışkı kaynaklı indirekt bulaşmalar da gerçekleşebilmektedir (7,17). Pastörizasyon sıcaklık-zaman düzeneklerinde sütlerde MAP etkenlerinin canlılıklarını koruyabildiği (15,18,19), pastörize süt ve süt ürünlerinden izolasyonun yapıldığı (15), D-değerinin diğer patojenlerden yüksek olduğu ortaya konmuştur (14).

Peynir, yoğurt, krema, tereyağı, dondurma gibi süt ürünlerinin yanı sıra içeriklerinde süt ve bileşenlerini ihtiva eden gıdalar da önem arz etmektedir. MAP etkenleriyle kontamine çiğ sütte pastörizasyon sonrası canlı kalabilen etkenler süt ürünleri için potansiyel risk oluşturmaktadırlar (7). Dolayısıyla MAP etkenleriyle kontamine süt ve süt ürünleri tüketiminin insanlarda Crohn hastalığının etiolojisinde rol oynayabileceği düşüncesi güçlenmektedir (15). Bunun yanı sıra dünya genelinde özellikle süt sığırlarında Johne hastalığı ile insanların Crohn hastalığı insidensindeki artışların paralellik arz etmesi, bu hastalıklar arasındaki olası ilişkinin yorumlanmasında dolaylı da olsa bilgiler sunmaktadır (13).

4. Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri

Süt ve süt ürünlerinde kültür ve direkt tanı yöntemleri ile MAP etkenleri araştırılabilmektedir. Bu yöntemlerin yanı sıra serolojik ve moleküler teknikler veya bu tekniklerin kombinasyonlarıyla hızlı tanı yöntemleri geliştirilmiştir (14,15).

4.1. Kültürel Metotlar

Kültürel metotlarla canlı MAP etkenlerinin izolasyonu "gold standart" olarak kabul edilmektedir (15,20). Buna karşın özellikle süt kaynaklı diğer mikroorganizmalara oranla uzun süren inkübasyon periyodu (18 ile 52 hafta arası) (7,21), uygun selektif besiyeri seçiminin güçlüğü, spesifik besin öğelerine ihtiyaç göstermesi, enfekte hayvanların sütlerinde düşük sayıda etken bulunması vb. faktörler bu

metotların kullanılabilirliğini olumsuz etkilemektedir (7,11).

Kültür öncesinde uygulanan dekontaminasyon işlemleri de subklinik enfekte hayvanların sütlerinde yer alan az sayıdaki mikroorganizmanın inaktivasyonuna neden olabilmektedir (21). Ancak süt ve süt ürünlerinden etkin bir kültürel izolasyon için dekontaminasyon uygulamaları tercih edilmektedir (7). Bu amaçla örneklerden besiyerlerine ekim yapılmadan önce rekabetçi mikroflora etkenlerinin gelişmesini engellemek için hekzadesilpiridinyum klorür, sodyum hidroksit, oksalik asit, benzalkonyum klorür gibi kimyasallardan yararlanılmaktadır (20,22).

Genel olarak sütün mikrobiyolojik analizlerinde santrifüj, zenginleştirme ve immunomanyetik separasyon (IMS) vb. bir ön işlem sonrası besiyerine geçiş yapılması tercih edilmektedir (20). Sütlerde bulunan mikroorganizma sayısı dışarıya oranla daha az olduğundan etkenlerin izolasyonunu sağlayabilmek amacıyla sütlere santrifüj uygulaması tercih edilmektedir. Santrifüj işlemiyle süt üç fraksiyona (su, pelet, krema) ayrılmaktadır. MAP etkenlerinin özellikle pelet ve krema kısımlarında yer aldığı bilinmekte ve inokülasyon için bu kısımlar kullanılmaktadır (22). Zenginleştirme işlemi karışık mikroflorada hedeflenen mikroorganizmanın gelişmesini sağlamak ve olası hücrel hasarların giderilmesi amacıyla yapılmaktadır. Sığır albümini, dekstroz, katalaz ve oleik asit içeren Middlebrook OADC Growth Supplement kullanımı buna örnek olarak gösterilebilir (20). IMS yöntemi; paramanyetik özellikteki boncuklar üzerine spesifik antikorların kaplanması ve bu antikorların süt örneklerinde bulunabilecek MAP antijenleri ile bağlanması yoluyla selektif ayırım yapılması esasına dayanmaktadır (7).

En yaygın kullanılan katı besiyerleri, Herrold's egg yolk medium (HEYM), Lowenstein-Jensen medium (LJ) ve Middlebrook 7H10/7H11 medium'dur. Bunlara alternatif olarak Middlebrook 7H9, BACTEC 12B, MGIT 960, ESP II Culture System, MB/BacT System gibi sıvı besiyerleri de sıklıkla kullanılabilir (7,20,22). Tespit limitlerinin 1-10 kob/ml ile 1-10 kob/100ml arasında değiştiği bildirilmektedir. Süt ve süt ürünlerinden MAP etkenlerinin izolasyon oranını artırmak için katı ve sıvı

besiyerlerinin birlikte kullanımları tercih edilmektedir (7).

Bu besiyerleri, örneklerde bulunabilecek rekabetçi mikroflorayı baskılamak amacıyla uygun antibiyotik karışımı içermekte ve ayrıca üreme faktörü olarak siderofor özellikli mycobactin J supplementi ilave edilmektedir (20,22). MAP etkenleri diğer *Mycobacteria* üyelerinden farklı olarak kendi mikobaktinini sentezleyememektedir. Bakterinin in vitro gelişimi için ekzojen mikobaktine olan bu gereksinimi diğer bakterilerden ayırıcı kriter olarak değerlendirilmektedir. Demirle şelat oluşturarak bakterinin çoğalmasında respiratör aktiviteyi sağlayan supplementlerin ortamda bulunmaması durumunda gelişim ancak demir sağlayan hücreler vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir (11,22).

4.2. Direkt Tanı Yöntemleri

Süt ve süt ürünlerinden MAP etkenlerinin direkt tanı yöntemleriyle tespiti yaygın olarak kullanılmamakla birlikte doğrulayıcı tanı amaçlı bilgiler sunmaktadır. Bu yöntemler arasında; örneklerin Ziehl-Neelsen boyamayı takiben mikroskopta incelenmesi, floresan mikroskop kullanımı, katı faz sitometri ve biyoluminesans yöntemleri yer almaktadır (15).

4.3. Serolojik Testler

Serolojik testler özellikle sürülerde MAP seroprevalansının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca serolojik testler; radyoimmün testler (radioimmunoassay-RIA), enzim bağlı immün testler (enzyme-linked immunosorbent assay-ELISA), agar jel immüno difüzyon testi (agar gel immunodiffusion-AGID) ve komplement fiksasyon (complement fixation-CF) testleridir (14). Ancak çevresel kaynaklı MAP dışındaki etkenler seroprevalans değerlerinin doğru tespitinde sorun yaratmaktadır. Sığırlarda enfeksiyonun ilk dönemlerinde, biyolojik sıvılarda, genellikle MAP etkenlerine karşı üretilen antikorlar bulunmamaktadır (23).

4.3.1. Radyoimmün Testler

Radyoimmün testler (RIA), Rosalyn Yalow ve Solomon Berson tarafından 1959 yılında geliştirilmiştir. Biyolojik sıvılarda aranan bir

maddenin varlığı reaksiyon ve tespit olarak iki aşamada gerçekleşmektedir. RIA, bir antikorun hormon gibi (ya da başka bir moleküle) bir antijene geri dönüşümlü olarak bağlanma yeteneğine dayanmaktadır. Pozitif reaksiyonlar da, antijen-antikor kompleksi oluşarak bir radyoaktivite kazanmaktadır. Radyoizotopik olarak işaretlenmiş moleküller kullanılarak oldukça küçük miktardaki antijen, antikor ya da antijen-antikor kompleksinin ölçümü mümkün hale gelmektedir (24). Meylan ve ark (25), kolostrumda MAP etkenlerinin tespiti amacıyla RIA metodunu kullanmışlardır. Radyoaktif izotoplar kullanılması sebebiyle uygulamasının zor ve pahalı olması daha az tercih edilen bir metot olmasına neden olmaktadır (24).

4.3.2. Enzim Bağlı İmmün Testler

ELISA testi, MAP antikorlarına spesifik antijenlerin kullanımıyla sütlerde bulunabilecek MAP etkenlerinin tespit edildiği benimsenmiş bir yöntemdir (15,22). ELISA testinde bu amaç için kullanılan ilk antijen lipoarabinomannan olmuştur (15). ELISA testi, sütlerde MAP etkenlerinin tespiti amacıyla ilk defa 1994 yılında (26) kullanılmış olup sonrasında birçok araştırmacı (27,28,29) tarafından uygulama alanı bulmuştur.

ELISA metodu; 24 saat içerisinde sonuç alınabilmesi, nispeten az maliyetli olması ve kolaylığından dolayı günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır (22). Özellikle subklinik enfekte hayvan sütlerinden insanlara olası bulaşmaların engellenmesi ve dolayısıyla halk sağlığının korunması amacıyla MAP etkenlerinin tespitinde ELISA metodunun etkili bir yöntem olduğu kabul edilmektedir (30). Ancak bireysel olarak hayvanlarda antikor tespit duyarlılıkları daha düşük bulunmuştur. Nitekim çiğ süt tanklarında antikor tespit duyarlılığı %97 (23) iken subklinik enfekte hayvanların sütlerinde bu oran %21-61 arasındadır (22). Diğer *Mycobacteria* türleriyle kontamine hayvanların sütlerinde bulunabilecek antikorlardan dolayı yanlış pozitif ve enfekte hayvanların sütlerinde her zaman antikorların bulunmaması nedeniyle yanlış negatif sonuçlar alınabilmesi metodun dezavantajları arasında sayılabilmektedir (15).

4.3.3. Agar Jel İmmünodifüzyon Testi

Agar jel immünodifüzyon (AGID) testi, antikor ve antijenlerin yarı katı jelde açılan delikler arasındaki bölgede kümelenmesi esasına dayanan bir yöntemdir. Uygulanması kolay ve düşük maliyetlidir. Fakat düşük hassasiyet oranı subklinik enfekte sürülerde etkili bir tarama testi olarak kullanılmasına engel olmaktadır. Bu yüzden şüpheli hayvanlardan elde edilen biyolojik materyallerde MAP varlığının araştırılmasında genellikle doğrulayıcı tanıda kullanılmaktadır (14,31).

4.3.4. Komplement Fiksasyon Testi

Komplement fiksasyon (CF) testi, sürülerde MAP seroprevalans tespit çalışmalarında kullanılmıştır. Ancak kullanılan ticari test kitlerinde özellikle hastalığın evresine bağlı olarak değişkenlik gösteren duyarlılık seviyeleri ve diğer bakterilerle çapraz reaksiyonlar oluşturması nedeniyle fazla tercih edilmemektedir (14,23).

4.4. Moleküler Testler

Örneklerde nükleik asit tespitine dayalı moleküler yöntemler, yüksek doğruluk oranı ve 0.01 pg miktarındaki DNA'nın tespitine olanak vermesi nedeniyle mikobakteriyolojik analizlerde güvenilir olarak kullanılmaktadır (23). Moleküler teşhis için polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction-PCR) ve PCR'in modifikasyonu sonucu geliştirilen birçok yöntem (özellikle proplarla nükleik asit hibridizasyonu, immunomanyetik separasyon PCR, Nested PCR, Real-Time PCR) kullanılabilmektedir (14,15).

4.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, in vitro koşullarda hedef nükleik asit zincirlerinin primerlerle çoğaltılarak etken identifikasyonuna olanak sağlayan bir yöntemdir. Saf kültürlerden elde edilen DNA materyallerinden oldukça yüksek spesifitede sonuçlar alınmaktadır. Fakat klinik örneklerde yapılan analizlerde çeşitli inhibitör maddelerin varlığı ve ekstraksiyon tekniklerinin yetersizliği vb. faktörler spesifitenin azalmasına neden olmaktadır (32).

Süt ve diğer materyallerde MAP etkenlerinin varlığının araştırılmasında hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiği bilinmektedir. Sütlerde MAP etkenlerinin araştırılması amacıyla farklı sekans bölgelerinin incelendiği PCR protokolleri geliştirilmiştir. Özellikle *IS900* ve *f57* spesifik DNA sekanslarının bulunması etken tespitinde bu alanda ilerlemelere neden olmuştur (15).

4.4.1.1. *IS900* DNA Sekansı

Tespit edildiği 1989 yılından itibaren *IS900* gen sekansının araştırılması MAP etkenleri için en sık tercih edilen metot olmaktadır (14,15). MAP etkenlerini *Mycobacterium avium* türlerinden ayırmada kullanılmaktadır. *IS900* gen sekansı 399 amino asidi kodlayan 1451 baz çifti uzunluğunda bir bölge olup bu sekans bölgesinden elde edilen primerler (Tablo 2) süt ve süt ürünlerinde MAP etkenlerinin teşhisinde kullanılabilir (14,23).

4.4.1.2. *f57* DNA Sekansı

İlk kez 1993 yılında bir *Mycobacterium paratuberculosis* suşundan izole edilen bu sekans da MAP etkenlerini *Mycobacterium avium* türlerinden ayırmada kullanılmaktadır. G+C içeriği %58.9 olup 620 baz çifti uzunluğunda bir bölgedir. Diğer MAC üyelerinde bulunmayan *f57* DNA sekansından elde edilen primerlerle (Tablo 2) birçok çalışma yürütülmüştür (14,23). Süt ve süt ürünlerinde MAP etkenlerinin tespitinde nispeten daha az duyarlı olduğu kabul edildiğinden *IS900* sekans analizlerini destekleyici nitelikte kullanımı daha yaygındır (23,33).

4.4.1.3. Diğer Sekanslar

MAP etkenlerinin varlığının araştırıldığı PCR temelli çalışmalarda *IS900* ve *f57* sekanslarının yanı sıra farklı DNA segmentleri de kullanılmaktadır. Bunlara; *HspX*, *ISMap2* (15), *ISMAP02*, *LSP^a8*, *Hsp65* (23), locus 251 ve locus 255 (33, 34) örnek verilebilir.

Tablo 2. Süt ve Süt Ürünlerinde MAP Araştırılmasında Kullanılan Bazı *IS900* ve *f57* Sekans Primerleri.

Table 2. Some *IS900* and *f57* Sequence Primers Used in MAP Research in Milk and Milk Products.

Örnek	Sekans Bölgesi	Primer Dizilimi	Araştırmacılar
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-CGTCGTTAATAACCATGCAG-3') R(5'-GGCCGTCGCTTAGGCTTCGA-3')	Giese ve Ahrens (35) Djonne ve ark (36)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-CCGCTAATTGAGAGATGCGATTGG-3') R(5'-AATCAACTCCAGCAGCAGCGCGCCTCG-3')	Pillai ve Jayarao (37)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-GATGGCCGAAGGAGATTG-3') R(5'-CACAACCACCTCCGTAACC-3')	Slana ve ark (21)
Süt	<i>IS900</i>	F(5'-ACCCGCTGCGAGAGCAATCGCTGC-3') R(5'-ACGTCGGCGTGGTCGTCGCTGGG-3')	Gilardoni ve ark (38)
Peynir	<i>IS900</i>	F(5'-AATGACGGTTACGGAGGTGGT-3') R(5'-GCAGTAATGGTC GGCCTTACC-3')	Galiero ve ark (39)
Süt bazlı bebek maması	<i>IS900</i>	F(5'-GAAGGGTGTTCGG GGCCGTCGCTTAGG-3') R(5'-GGCGTTGAGGTCGATCGCCACGT GAC-3')	Botsaris ve ark (40)
Süt	<i>f57</i>	F(5'-GCCATTTTCATCGATACCC-3') R(5'-GTACCGAATGTTGTTGTCAC-3')	Slana ve ark (21)
Süt	<i>f57</i>	F(5'-GGTCGCGTCATTCAGAATC-3') R(5'-TCTCAGACAGTGGCAGGTG-3')	Botsaris ve ark (41)
Süt, süt tozu, peynir	<i>f57</i>	F(5'-CCG CGA TCC CAA AAG TTG-3') R(5'-CTC GTA GCT GCC GAT TCA TG-3')	Donaghy ve ark (33)

SONUÇ

Siğirilerin yanı sıra koyun ve keçi gibi çiftlik hayvanlarında sıklıkla görülen MAP'ın, ısıtma işlemi görmüş/görmemiş süt ve ürünlerinde tespit edilmesi, diğer patojenlere göre D değerlerinin oldukça yüksek

olması ve ayrıca Crohn hastalığının etiyolojisinde de yer alabileceği yönündeki bazı bulgular halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından bu patojenin önemini arttırmaktadır.

Bu bağlamda MAP'ın bulaşma kaynaklarından erken ve etkin tespiti oldukça önem arz etmektedir.

Birçok besin patojenine göre uzun inkübasyon periyodu, uygun selektif besiyeri seçiminin güçlüğü, spesifik besin öğelerine ihtiyaç göstermesi, enfekte hayvanların sütlerinde düşük sayıda etken bulunması v.b dezavantajlarından dolayı besinlerdeki insidensi ve yoğunluğu hakkında gerçek değerlere ulaşmak da oldukça zordur.

MAP'ın tespit edilmesinde kullanılan klasik kültürel yöntemlerin yanı sıra direkt tanı yöntemleri, serolojik ve moleküler testlerin kullanılması ve geliştirilmesi, sürü sağlığı, gıda güvenilirliği ve halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

KAYNAKLAR

- Holt JG., Krieg NR., Sneath PHA., Staley JT., Williams ST., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., 597-604, Williams & Wilkins A Waverly Company, Baltimore, Maryland.
- Behling RG., Eifert J., Erickson MC., Gurtler JB., Kornacki JL., Line E., Radcliff R., Ryser ET., Stawick B., Yan Z., 2010. Selected Pathogens of Concern to Industrial Food Processors: Infectious, Toxigenic, Toxic Infectious, Selected Emerging Pathogenic Bacteria. In "Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment" Ed., JL Kornacki, 1st ed., 5-62, Springer Science Business Media, New York.
- Hermon-Taylor J., Bull TJ., Sheridan JM., Cheng J., Stellakis ML., Sumar N., 2000. Causation of Crohn's disease by *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Can J Gastroenterol, 14, 521-539.
- Harris NB., Barletta RG., 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. Clin Microbiol Rev, 14, 489-512.
- Windsor PA., 2015. Paratuberculosis in sheep and goats. Vet Microbiol, 181, 161-169.
- Hermon-Taylor J., El-Zaatari FAK., 2004. The *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* problem and its relation to the causation of Crohn disease. In "World Health Organization, Pathogenic *Mycobacteria* in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management", Ed., Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J, 1st ed., 74-94, IWA Publishing, London.
- Grant IR., Rowe MT., Dundee L., Hitchings E., 2001. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: its incidence, heat resistance and detection in milk and dairy products. Int J Dairy Technol, 54, 2-13.
- McAloon CG., Whyte P., More SJ., Green MJ., O'Grady L., Garcia A., Doherty ML., 2015. The effect of paratuberculosis on milk yield-A systematic review and meta-analysis. J Dairy Sci, 99, 1449-1460.
- Geraghty T., Grahamb DA., Mullowney P., More SJ., 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. Prev Vet Med, 116, 1-11.
- Ailsa LH., Siew CN., 2015. Crohn's disease. Medicine, 43, 282-290.
- Güner A., 2004. Crohn Hastalığının Etiyolojisinde *Mycobacterium paratuberculosis* (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*)'in Rolü ve Besinlerle Bulaşma Riski. E.Ü. Journal of Health Sciences, 13, 48-54.
- Laass MW., Roggenbuck D., Conrad K., 2014. Diagnosis and classification of Crohn's disease. Autoimmun Rev, 13, 467-471.
- Davis WC., Madsen-Bouterse SA., 2012. Crohn's disease and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: The need for a study is long overdue. Vet Immunol Immunopathol, 145, 1-6.
- Patel A., Shah N., 2011. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Incidences in milk and milk products, their isolation, enumeration, characterization, and role in human health. J Microbiol Immunol Infect, 44, 473-479.
- Slana I., Paolicchi F., Janstova B., Navratilova P., Pavlik I., 2008. Detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk and milk products: a review. Vet Med-Czech, 53, 283-306.
- Botsaris G., Slana I., Liapi M., Dodd C., Economides C., Rees C., Pavlik I., 2010. Rapid detection methods for viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in milk and cheese. Int J Food Microbiol, 141, 87-90.
- Foddai ACG., Grant IR., 2015. An optimised milk testing protocol to ensure accurate enumeration of viable *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by the PMS-phage assay. Int

- Dairy J, 51, 16-23.
18. Lund BM., Gould GW., Rampling AM., 2002. Pasteurization of milk and the heat resistance of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review of the data. *Int J Food Microbiol*, 77, 135-145.
 19. Donaghy JA., Totton NL., Rowe MT., 2003. Evaluation of culture media for the recovery of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from Cheddar cheese. *Lett Appl Microbiol*, 37, 285-291.
 20. Donaghy JA., Rowe MT., Rademaker JLW., Hammer P., Herman L., De Jonghe V., Blanchard B., Duhem K., Vindel E., 2008. An inter-laboratory ring trial for the detection and isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk artificially contaminated with naturally infected faeces. *Food Microbiol*, 25, 128-135.
 21. Slana I., Kralik P., Kralova A., Pavlik I., 2008. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by *IS900* and *F57* competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol*, 128, 250-257.
 22. Bradner LK., 2013. Optimization of methods for culturing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine milk and colostrum and application to samples collected from naturally infected dairy cows. Iowa State University, Graduate Theses and Dissertations, USA.
 23. Timms VJ., Gehringer MM., Mitchell HM., Daskalopoulos G., Neilan BA., 2011. How accurately can we detect *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection? *J Microbiol Methods*, 85, 1-8.
 24. Lacy A., O'Kennedy R., 2005. Immunoassay, Techniques. In "Encyclopedia of Analytical Science", Ed., P Worsfold, A Townshend, C Poole, 2nd ed., 335-344, Elsevier Academic, San Diego.
 25. Meylan M., Rings DM., Shulaw WP., Kowalski JJ., Bech-Nielsen S., Hoffsis GF., 1996. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental conditions simulating pasteurization. *Am J Vet Res*, 57, 1580-1585.
 26. Sweeney RW., Whitlock RH., Buckley CL., Spencer P., Rosenberger AE., Hutchinson LJ., 1994. Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res*, 55, 905-909.
 27. Cazer CL., Mitchell RM., Cicconi-Hogan KM., Gamroth M., Richert RM., Ruegg PL., Schukken YH., 2013. Associations between *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* antibodies in bulk tank milk, season of sampling and protocols for managing infected cows. *BMC Vet Res*, 9, 1-7.
 28. Nielsen SS., Toft N., 2014. Bulk tank milk ELISA for detection of antibodies to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: Correlation between repeated tests and within-herd antibody-prevalence. *Prev Vet Med*, 113, 96-102.
 29. Beaver A., Cazer CL., Ruegg PL., Gröhn YT., Schukken YH., 2016. Implications of PCR and ELISA results on the routes of bulk-tank contamination with *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*. *J Dairy Sci*, 99, 1391-1405.
 30. Pinedo PJ., Williams JE., Monif GRG., Rae DO., Buergelt CD., 2008. *Mycobacterium paratuberculosis* shedding into milk: Association of ELISA seroactivity with DNA detection in milk. *Intern J Appl Res Vet Med*, 6, 137-144.
 31. Ferreira R., Fonseca LS., Lilenbaum W., 2002. Agar gel immunodiffusion test (AGID) evaluation for detection of bovine paratuberculosis in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett Appl Microbiol*, 35, 173-175.
 32. Çetinkaya B., Muz A., Ertuş HB., Öngör H., Sezen İY., Gülcü HB, 2000. Süt ineklerinde paratüberküloz prevalansının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile saptanması. *Turk J Vet Anim Sci*, 24, 371-379.
 33. Donaghy JA., Johnston J., Rowe MT., 2011. Detection of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in cheese, milk powder and milk using *IS900* and *f57*-based qPCR assays. *J Appl Microbiol*, 110, 479-489.
 34. Grant IR., Rees CED., 2010. *Mycobacterium*. In "Molecular Detection of Foodborne Pathogen", Ed., Liu D, 1st ed., 229-240, CRC Press, London.
 35. Giese SB., Ahrens P., 2000. Detection of

- Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol*, 77, 291-297.
36. Djonne B., Jensen MR., Grant IR., Holstad G., 2003. Detection by immunomagnetic PCR of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from dairy goats in Norway. *Vet Microbiol*, 92, 135-143.
37. Pillai SR., Jayarao BM., 2002. Application of IS900 PCR for detection of *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* directly from raw milk. *J Dairy Sci*, 85, 1052-1057.
38. Gilardoni LR., Fernandez B., Morsella C., Mendez L., Jar AM., Paolicchi FA., Mundo L., 2016. *Mycobacterium paratuberculosis* detection in cow's milk in Argentina by immunomagnetic separation-PCR. *Braz J Microbiol*, 47, 506-512.
39. Galiero A., Fratini F., Mataragka A., Turchi B., Nuvoloni R., Ikonomopoulos J., Cerri D., 2016. Detection of *mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in cheeses from small ruminants in Tuscany. *Int J Food Microbiol*, 217, 195-199.
40. Botsaris G., Swift BMC., Slana I., Liapi M., Christodoulou M., Hatzitofi M., Christodoulou V., Rees CED., 2016. Detection of viable *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in powdered infant formula by phage-PCR and confirmed by culture. *Int J Food Microbiol*, 216, 91-94.
41. Botsaris G., Liapi M., Kakogiannis C., Dodd CER., Rees CED., 2013. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bulk tank milk by combined phage-PCR assay: Evidence that plaque number is a good predictor of MAP. *Int J Food Microbiol*, 164, 76-80.



Clostridium difficile: Yeni Bir Gıda Patojeni mi?

Zeynep ALATAŞ¹, Ahmet GÜNER²✉

1. Tarım ve Orman Bakanlığı, Konya Gıda Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Birimi, Konya, TÜRKİYE.
2. Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Konya, TÜRKİYE.

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.12.2017	30.03.2018	25.12.2018

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Alataş Z, Güner A: *Clostridium difficile*: Yeni Bir Gıda Patojeni mi?. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 13 (3): 389-396, 2018. DOI:10.17094/ataunivbd.364311

Öz: Doğada yaygın olarak bulunan *Clostridium difficile*, antibiyotik ilişkili ishal, pseudomembranöz kolit ve fulminant kolit olmak üzere çeşitli klinik tabloların şekillenmesine sebep olabilen nozokomiyal fırsatçı bir patojendir. Antibiyotiğe bağlı ishallerin %15-25'inden, psödomembranöz kolitlerin hemen hemen hepsinden sorumlu olduğu düşünülen *C. difficile*'in hipervirülan suşlarının ise genellikle nüks oranı yüksek ve şiddetli enfeksiyonlara hatta ölüme yol açtıkları bilinmektedir. *C. difficile*'in gıdalardan insanlara bulaşarak enfeksiyon yaptığına dair henüz yeterli veri bulunmamakla birlikte son yıllarda yapılan çalışmalarda *C. difficile* enfeksiyonlarında çarpıcı bir artış olduğunun belirtilmesi, etkenin aynı zamanda hayvansal gıdalardan, çiğ veya tüketime hazır gıdalardan, sebzelerden, salatalardan, deniz, göl ve nehir sularından, su ürünlerinden, topraktan ve çeşitli çevresel numunelerden izole edilmiş olması, *C. difficile*'in gıda kaynaklı bir patojen olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. *C. difficile*'in gıdalarda tespit edilen bazı suşlarının toksijenik özellik taşımaları, antibiyotiklere karşı değişen oranlarda dirençli olmaları ve zor şartlara dayanıklı endosporları sayesinde kolayca yayılabilme özellikleri ise bu bakterinin önemini giderek arttırmaktadır. Bu derlemede *C. difficile*'in genel özellikleri, patojenitesi, enfeksiyon kaynakları, risk faktörleri, gıdalarda varlığı, gıdalardan izolasyonu ve identifikasyonu hakkında bilgilere yer verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Clostridium difficile*, Gıda kaynaklı hastalıklar, Gıda mikrobiyolojisi.

Clostridium difficile: Is it a New Food-Borne Pathogen?

Abstract: *Clostridium difficile*, commonly found in nature, is a nosocomial opportunistic pathogen which causes formation of various clinical disorders including antibiotic associated diarrhea, fulminant colitis and pseudomembranous colitis. *C. difficile* is thought to be responsible for almost all of the pseudomembranous colitis and 15-25% of the antibiotics related diarrhea. Also it is known that hypervirulent strains generally have high recurrence rate and cause severe infections or even death. Although there is not enough data that *C. difficile* infects people by transmission via food, there is a significant increase in infections caused by *C. difficile* in recent studies. In addition to this knowledge bacteria have been isolated from various samples which animal foods, raw or ready to eat foods, vegetables, salads, the waters of sea, lake and river, seafood, soil and environmental samples. All of these bring to mind a question that *C. difficile* is whether or not a food-borne pathogen. Toxigenic characteristics of some strains of *C. difficile* detected in foods, resistance to antibiotics in various ratios and their spreading easily properties due to endospores resistant to difficult conditions have further increased the importance of this bacterium. In this review, the information about general characteristics, pathogenesis, infection sources, risk factors, presence in food, isolation from food and identification of *C. difficile* have been given.

Keywords: *Clostridium difficile*, Food-borne diseases, Food microbiology.

GİRİŞ

Clostridium cinsinin büyük çoğunluğu biyoyakıt üretimi de dahil olmak üzere, yararlı biyotransformasyonları gerçekleştirebilme kabiliyetine sahiptir. Bazı türlere (örn.; *Clostridium sporogenes*, *Clostridium novyi*) ait spor formlarının kanser tedavisinde önemli bir rol oynadıkları da iddia edilmektedir. Bilinen bu özelliklerine rağmen *Clostridium* türleri sebep oldukları hastalıklardan dolayı insanlar için genellikle tehlikeli olarak düşünülmektedir (1).

Clostridium difficile, antibiyotiğe bağlı ishallerin %15-25'inden, psödomembranöz kolitlerin ise hemen hemen hepsinden sorumlu olduğu düşünülen ve doğada yaygın olarak bulunan, nozokomiyal fırsatçı bir patojendir (2).

Son on yılda ciddi bir artışın olduğu *C. difficile* enfeksiyonları (CDE) için risk faktörü olarak bazı gıdalar şüpheli görülmektedir. Bu konuda kesin bir kanıt bulunmamakla birlikte gıdaların gerçekten enfeksiyon kaynağı olup olmadığını belirlemek de oldukça zordur (3).

1. Tarihçe ve Taksonomi

İlk olarak 1935 yılında Hall ve O'Toole tarafından sağlıklı yenidoğanlar ile bir yaşına kadar olan bebeklerin dışkılarından Gram pozitif, anaerobik ve sitotoksin üretebilen bir bakteri izole edilmiş, bu bakterinin küçük yaşlarda barsak florasının normal bir üyesi olduğu bildirilmiştir (4). Hall ve O'Toole, izolasyon ve kültürünü yaparken karşılaştıkları zorlukları yansıtmak için bakteriyeye *Bacillus difficilis* adını vermişlerdir (5). İlk kez 1978 yılında klindamisine ilişkili kolite sebep olduğunun anlaşılmasının ardından 1989-2002 yıllarında Amerika Birleşik Devleti'nde klindamisine dirençli *C. difficile*'ye bağlı salgınlar bildirilmiş, 2003-2006 yıllarında ise Kuzey Amerika ve Avrupa'da klinik şiddeti ve mortalite oranı yüksek, fazla miktarda

toksin üreten ve florokinolonlara dirençli *C. difficile* suşu (BI/NAP1/027) tespit edilmiştir (6). *C. difficile*'in sınıflandırılması ise Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'de şu şekilde yapılmıştır (7).

Şube:	Firmicutes
Sınıf:	Clostridia
Takım:	Clostridiales
Familiya:	Clostridiaceae
Cins:	Clostridium
Tür:	<i>C. difficile</i>

2. C. difficile ve Gelişme Özellikleri

C. difficile, 0.5-1.9 µm eninde, 3.0-16.9 µm boyunda, Gram pozitif bir basildir. Bazı suşlar 2-6 hücreden oluşan zincirler oluşturabilmektedirler (7). Bakteri, hücrelerinden daha geniş ve bazen terminal, çoğunlukla subterminal yerleşimli spora sahiptir (4,7). *C. difficile*, optimum üreme sıcaklığı 30-37°C olan, zorunlu anaerobik bir bakteridir. İnkübasyon için %10 CO₂, %10 H₂ ve %80 N₂'ye ihtiyaç duymakta ve ilk izolasyonda içerisinde kan, serum, yumurta sarısı, fruktoz bulunan besiyerleri kullanılmaktadır. Sikloserin sefoksitin fruktoz agar (CCFA) *C. difficile* izolasyonunda çok tercih edilen bir besiyeridir (4).

3. Virülens Faktörleri

C. difficile'in temel virülens faktörleri olarak, bir enterotoksin olan toksin A ve bir sitotoksin olan toksin B bildirilmektedir. Bazı suşları (örn.; *C. difficile* ribotip 027, ribotip 078) tarafından ADP-ribosyltransferase aktivitesine sahip bir toksin olan *C. difficile* transferase (CDT) üretilmektedir. Ancak CDT'nin virülense sağladığı katkı tam olarak bilinmemektedir (8). İzole edilen *C. difficile* suşlarının %75'inin toksijenik olduğu bildirilmektedir (4). Toksijenik *C. difficile* suşları, bilinen toksinlerden en az birini üretmektedirler. Ürettikleri toksin çeşidine bağlı olarak farklı toksinotipler mevcuttur (Tablo 1).

Tablo 1. *C. difficile*'in Toksinotipleri (9).**Table 1.** Toxinotypes of *C. difficile* (9).

Toksinotip	Toksin A	Toksin B	CDT
0, I, II, XII, XIII, XVIII– XXII	+	+	-
III–VII, IX, XIV, XV, XXIII, XXIV	+	+	+
VIII	-	+	-
X, XVI, XVII	-	+	+
XI ve bazı PaLoc* negatif suşlar	-	-	+
Nontoksijenik suşlar	-	-	-

*PaLoc: Patojenite lokusu veya adası olarak bilinen, toksin A ve toksin B'yi kodlayan genom bölgesi.

Toksin A 308 kDa, toksin B ise 270 kDa molekül ağırlığındadır. Her iki toksin de protein yapısında olmakla birlikte asitlere, proteolitik enzimlere ve ısıya karşı duyarlıdır (4). Toksin A, kolon mukozasındaki reseptörlere tutunmayı sağlayarak, mukoza hasarı ve inflamasyona sebep olan mediyatörlerin salınımını uyarmaktadır. Toksin B ise direkt olarak kolon mukozasında hasara yol açmaktadır (6).

C. difficile, olumsuz çevre koşullarında dirençli endosporlar oluşturmaktadır. Sporların bakterinin hastane ortamında yayılmasında önemli bir etken olduğu düşünülmektedir (10). Antibiyotik direnci kazandıran, toksin üretimini arttıran, sporulasyonu kolaylaştıran çeşitli mutasyonlar da, *C. difficile*'in görülme sıklığını ve virülensini önemli ölçüde arttırmaktadır (5).

3.1. *C. difficile*'in Hipervirülen Suşları

Toksin üretme kapasitesi yüksek olan suşlar "hipervirülen suşlar" olarak bilinmektedir. Bu suşlar genellikle nüks oranı yüksek olan şiddetli enfeksiyonlara ve ölüme sebep olabilmektedirler (11). *C. difficile*'in BI/NAP1/027 olarak adlandırılan hipervirülen suşunun dünyada son yıllarda artan CDE salgınları ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bu suşlar, florokinolonlara dirençli olup diğer suşlara (örn.; toksinotip 0) göre 16-23 kat daha fazla toksin üretme kapasitesine sahiptirler (12).

3.2. *C. difficile*'in Antibiyotik Direnci

CDE'nin tedavisinde genellikle metronidazol veya vankomisin kullanılmaktadır (13). Ancak yapılan bazı çalışmalarda tedavide kullanılan bu antibiyotiklere karşı dirençli suşların varlığı bildirilmiştir (14,15). Palaez ve ark. (14), 1999-2000

yılları arasında topladıkları 415 *C. difficile* suşunun 26'sında (%6.3) metronidazole karşı direnç saptamışlardır. Dworzynski ve ark (15) ise Polonya'da disk diffüzyon yöntemiyle yaptıkları çalışmada vankomisine dirençli suşlar tespit etmişlerdir. Kıyma örneklerinde klindamisin ve moksifloksasine (16), bazı sebzelere klindamisin, eritromisin ve sefotaksime (18), tavuklarda sefotaksim, gentamisin, siprofloksasin, norfloksasin ve nalidiksik asite (19) dirençli suşlar izole edilmiştir.

4. Enfeksiyon Tablosu ve Patojenitesi

CDE, asemptomatik olabildiği gibi pseudomembransız kolit, psödomembranöz kolit ve fulminant kolit olmak üzere çeşitli klinik tablolarla da karşımıza çıkabilmektedir (4,6). Bir kişide CDE meydana gelebilmesi için üç ana faktör mevcut olmalıdır. İlk olarak hasta, mikroorganizma veya onun sporlarına maruz kalmış olmalı, hastanın barsak florası antibiyotik kullanmak suretiyle tahrip edilmiş olmalı ve mikroorganizma barsakta belli bir sayıya ulaşarak toksin üretmelidir (20).

Psödomembranöz kolit olgularında dışkılama sayısında artışla birlikte yüksek ateş, karın ağrısı, mide bulantısı, kusma gözlenmekte dışkıda ise bol lökosit ve eritrosit bulunmaktadır (6). Psödomembranöz kolitli hastaların barsaklarında da 2-10 mm arasında değişen beyazımsı-sarı renkli plaklar gözlenmektedir (4). Hastalığın başında dağınık ve küçük olan bu plaklar zamanla birleşerek tabaka şeklinde geniş bir alanı kaplamaktadır. Bu tabaka, psödomembranöz koliti diğer barsak iltihabı çeşitlerinden ayıran ve hastalığa adını veren bir yapıdır. Tedavi edilmeyen psödomembranöz kolit ölümcül olabilmektedir (21).

5. Enfeksiyon Kaynakları

C. difficile için deniz sedimenti, toprak, kum, hastane ortamı, insan, deve, at, eşek, kedi, evcil kuş ve köpeklerin dışkıları ile nadiren insan ve hayvan kanları kaynak olarak gösterilmektedir (7). *C. difficile* sağlık çalışanlarının elleri, tuvalet ve lavobolar, hastanede kullanılan araç-gereçler, endoskopi ekipmanları gibi çeşitli kaynaklardan izole edilmiştir. Kişiden kişiye bulaşma genellikle fekal-oral yolla olmaktadır (22). Çevresel faktörler içinde ellerin *C. difficile* sporları ile kontaminasyonu, en önemli bulaşma yolu olmakla birlikte henüz tespit edilememiş kaynaklar olması da muhtemel görülmektedir (23). Bakterinin spor formu ısıya dayanıklıdır ve insan midesi gibi asidik ortamlarda canlı kalmayı başarabilmektedir. *C. difficile* sporlarının, çeşitli dezenfektanlara maruz kaldıktan sonra bile hastane yüzeylerinden izole edilebildikleri bildirilmiştir (22).

6. Risk Faktörleri

CDE için en önemli risk faktörü yoğun antibiyotik kullanımınıdır. Ampisilin, amoksisilin, sefalosporinler, klindamisin ve fluorokinolonlar antibiyotikle ilişkili CDE şekillenmesinde yüksek risk taşımaktadır (24). Kullanılan antibiyotiklere bağlı olarak mikroorganizmaların bir yarış halinde bulunduğu kolon florasının yapısı bozulmakta, diğer anaerobik bakteriler ortamdan uzaklaştırılmakta ve baskın hale gelen *C. difficile* sporları vejetatif forma geçerek toksin üretmektedir (25).

İleri yaş (≥ 65) grubundaki kişilerde, hastanede yatmanın ve ağır hastalıklara maruz kalmanın CDE riskini arttırdığı iddia edilmektedir (13). *C. difficile*'ye bağlı ishale, barsakların ameliyat öncesi mekanik temizliği, radyasyon, yoğun bakım ünitesinde kalma, uzun süre hastanede yatma gibi etkenlerin de sebep olabileceği düşünülmektedir (4). Kesin bir kanıt bulunmamasıyla birlikte CDE için diğer bir risk faktörü ise proton pompa inhibitörlerinin kullanımınıdır (20). Özellikle yüksek riskli antibiyotik alan hastalarda, proton pompa inhibitörlerinin daha dikkatli kullanılmasının CDE önleme stratejisi açısından önem arz edeceği belirtilmektedir (26).

7. Gıdalarda Varlığı

Her geçen gün dünyanın çeşitli ülkelerinden virülensi yüksek ve antibiyotiklere dirençli *C. difficile* suşlarına bağlı yeni hastane salgınları ve yüksek ölüm oranları bildirilmektedir (5). Son yıllarda toplum ile ilişkili CDE'nin artması, gıdalarda ve kasaplık etlerde etkenin tespit edilmesi, hayvanlardan ve insanlardan izole edilen suşların benzerliği *C. difficile*'in gıda kaynaklı hastalığa sebep olabileceğini düşündüren temel faktörlerdir (3).

Tüketime hazır gıdalarda *C. difficile*, ilk olarak bombaj yapmış vakum paketli pişmiş etlerden tesadüfen izole edilmiştir (27). Bakri ve ark. (18), İskoçya'da tüketime hazır salata numunelerinde %7.5 (3/40), Metcalf ve ark. (17), Kanada'da marketlerde satışı sunulan çeşitli sebze ve meyvelerde (örn.; havuç, patates, sarımsak, zencefil, pancar, mantar, marul, yeşil soğan, turp, brokoli, kereviz kökleri, şalgam, pancar, kuşkonmaz) %4.5 (5/111), Eckert ve ark. (28) ise Fransa'da tüketime hazır salata ve sebze numunelerinde %2.9 (3/104) oranında toksijenik *C. difficile* suşları tespit etmişlerdir. Sebze ve meyvelerin kontamine olmasında toprak, gübre, su, işleme ortamları ve insan elleri gibi çeşitli muhtemel kaynakların rolleri olabileceği düşünülmektedir (3,18). Rodriguez ve ark. (29), Belçika'da bir huzur evinde domuz sosisi, hardal sosu ve havuç salatasından oluşan tek öğün yemeğinde ripotip 078 *C. difficile* suşu izole etmişlerdir. Rahimi ve ark. (30), İran'da çeşitli market ve restoranlarda tüketime sunulan paketlenmemiş yemeye hazır gıda örneklerinin %1.36'sında (5/368) *C. difficile* sporları tespit etmişlerdir. Esfandiari ve ark. (31), İran'da işlem görmüş hamburgerler ve hamburger üretim tesislerinden topladıkları numunelerin %4.2'sinde (9/211) *C. difficile*'ye rastlamışlar ve suşlardan %28.5'inin toksijenik olduğunu tespit etmişlerdir. Metcalf ve ark. (32), Kanada'da marketlerde satılan deniz ürünleri ve balıklarda %4.8 oranında (5/119) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Montazeri ve ark. (33) ise ıstiridye ve ıstiridyelerin yetiştirildiği ortamlardaki atık sularında toksijenik *C. difficile* tespit etmişlerdir.

Çiftlik hayvanlarında ve bunlara ait et örneklerinde de *C. difficile* varlığını belirlemek amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Rodriguez-Palacios ve ark. (34), Kanada'da perakende olarak

satılan toplam 60 kıyma örneğinin 11'i toksijenik olmak üzere 12'sinde (%20) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Simango ve Mwakurudza (19), Zimbabwe'de pazarlarda satılan tavukların dışkılarının %29'unda ve pazar yeri toprak örneklerinin ise %22'sinde *C. difficile* tespit etmişlerdir. Araştırmacılar bu çalışma verileri ışığında, şehir pazarlarında satılan tavukların *C. difficile*'in insanlara bulaşmasında önemli bir kaynak olabileceği ihtimalini vurgulamışlardır. Weese ve ark. (35), Kanada'da tüketime sunulan tavuk numunelerinin %12.8'inde toksijenik *C. difficile* suşu tespit ederken, Drigo ve ark. (36), et üretimi için yetiştirilen tavşanlarda bu oranı %66'sı (25/38) toksijenik olmak üzere %3 olarak (38/1279) bulmuşlardır. Jöbstl ve ark. (16), Avusturya'da 100 kıyma ve 50 çiğ süt numunesiyle yaptıkları bir çalışmada yalnızca kıyma örneklerinin 3'ünde (%3) *C. difficile* tespit etmişlerdir. Boer ve ark. (37), Hollanda'da marketlerde tüketime sunulan kuzu et örneklerinde %6.3, kanatlı et örneklerinde ise %2.7 oranında etken izole etmişler ve toplamdaki örneklerin %1.6'sını *C. difficile* yönünden pozitif bulmuşlardır. Güran ve İlhak (38), Türkiye'de iki ilde süpermarket ve kasaplarda tüketime sunulan parçalanmış tavuk örneklerinde 5'i toksijenik olmak üzere %8.06 oranında (25/310) *C. difficile* tespit etmişler ve sonuçların *C. difficile*'in gıda kaynaklı bir patojen olduğunu kanıtlayacak kadar kuvvetli bir kanıt teşkil etmediğini fakat tavuk etinde toksijenik *C. difficile*'in varlığının insanlar için bir risk anlamı taşıdığına gözardı edilmemesi gerektiğini ifade etmişlerdir. Rahimi ve ark. (39), İran'da sığır, inek, koyun, keçi, deve ve mandaya ait çiğ et örneklerinin %2'sinde (13/660) *C. difficile* varlığını tespit etmişlerdir. Songer ve ark. (40) ise Arizona'da pişmiş ve pişmemiş et ürünlerinde %42 oranında toksijenik *C. difficile* suşları tespit etmişlerdir.

8. Gıdalardan İzolasyonu ve İdentifikasyonu

C. difficile'yi gıdalardan izole ederken genellikle selektif bir zenginleştirme ortamı kullanılmakta sonrasında ise seçici besiyerinde üreyen kolonilerle identifikasyon ve doğrulama yapılmaktadır.

8.1. Zenginleştirme Ortamları ve Prosedürü

Gıda örneklerinden *C. difficile* izolasyonunda en uygun zenginleştirme ortamının hangisi olduğunu

belirlemek amacıyla araştırmacılar besiyerleri arasında karşılaştırma yapmışlardır. Jöbstl ve ark. (16), kıyma ve süt örneklerinden *C. difficile*'yi izole edebilmek amacıyla kullandıkları dört farklı zenginleştirme besiyeri (differential reinforced clostridial medium (DRCM), tryptone soy broth (TSB), thioglycolate broth (TG) ve *C. difficile* moxalactam norfloxacin (CDMN) broth) içerisinde en iyi sonucu %0.1 sodyum taurokolat ve TWEEN 80 ilave edilerek hazırlanmış CDMN brohtan aldıklarını ifade etmişlerdir. Songer ve ark. (40), zenginleştirme besiyeri olarak %0.5 maya ekstraktı, %0.05 DL-sistein ve %0.1 taurokolat içeren brain heart infusion (BHI) broth kullanmışlardır. Weese ve ark. (35), %0.1 sodyum taurokolat içeren CDMN broth kullanmışlar ve bu zenginleştirme metodunun düşük kontaminasyon oranına sahip numunelerde izolasyon şansını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Boer ve ark. (37), proteoz pepton, disodyum hidrojen fosfat, potasyum dihidrojen fosfat, magnezyum sülfat, sodyum klorür, fruktoz, sodyum taurokolat, at kanı ve *C. difficile* selektif supplement içeren bir broth kullanmışlardır. Selektif zenginleştirme besiyeri anaerobik koşullarda ve 37°C'de inkübe edilmektedir. Selektif sıvı besiyerinde yapılan zenginleştirme aşamasından sonra sporsuz bakterileri elimine etmek amacıyla alkol şoku uygulanmaktadır. Bu amaçla zenginleştirme kültürü 1:1 oranında %96'lık etanol ile karıştırılıp oda sıcaklığında bir saat inkübe edildikten sonra santrifüjlenerek elde edilen peletten selektif katı besiyerine ekim yapılmaktadır (35).

8.2. Katı Besiyerleri

C. difficile'in gıdalardan izolasyonu amacıyla çoğunlukla CDMN selective supplement ve %6 at kanı ilave edilerek hazırlanmış olan Fastidious anaerobe agar (19), Taurocholate cycloserine cefoxitin fructose agar (TCCFA) (40), Colombia kanlı agar (32) ve CDMN agar (16,34,35,37) kullanılmaktadır. Ekim yapılan besiyerlerinin inkübasyonu anaerobik şartlarda ve genellikle 37°C'de 48-72 saat süreyle yapılmaktadır (35).

8.3. İdentifikasyon ve Doğrulama

C. difficile, ilk olarak koloni morfolojisi, karakteristik kokusu ve pozitif L-prolin

aminopeptidaz aktivitesi ile tanımlanmaktadır (17). Koloni morfolojisi, deneyimsiz kişiler için, yeterince ayırt edici olmamakla birlikte kolonilerin kokusu fil ya da at gübresine benzetilmektedir (41). Selektif besiyerlerinde *C. difficile*'in tirozin metabolizması sonucu *p*-cresol üretmesi ile oluşan bu tipik koku identifikasyon açısından önemlidir (42,43). L-prolin-aminopeptidaz aktivite testi de *C. difficile*

tanımlanması için kullanılan az sayıdaki biyokimyasal testten biridir. *C. difficile*'den başka bu enzimi üreten diğer *Clostridium* türlerinin bir kısmı CCFA'da gelişmemekte, bir kısmı ise koloni morfolojisi yönünden farklılık göstermektedir (44). *C. difficile*'in identifikasyonunda biyokimyasal özellikler de oldukça önemlidir (Tablo 2).

Tablo 2. *C. difficile*'in Bazı Önemli Biyokimyasal Reaksiyonları (7).

Table 2. Some Important Biochemical Reactions of *C. difficile* (7).

Özellikler					Sonuç
İndol üretimi					-
Lesitinaz üretimi					-
Lipaz üretimi					-
Eskülin hidrolizi					+
Niştasta hidrolizi					-
Nitrat redüksiyonu					-
Kullandığı ve/veya kullanarak asit oluşturduğu substratlar					
Amigdalin	-	Laktoz	-	Riboz	-
Arabinoz	-	Maltoz	-	Salisin	w
Sellobiyoz	w	Mannitol	+/-	Sorbitol	w
Fruktoz	+	Mannoz	+/-	Niştasta	-
Galaktoz	-	Melezitoz	d	Sükroz	-
Glikojen	-	Melibiyoz	-	Trehaloz	w
İnositol	-	Rafinoz	-	Ksiloz	w
İnülin	-	Ramnoz	-	Süt reaksiyonu	-
Amigdalin	-	Laktoz	-	Riboz	-

+: *C. difficile* suşlarının % 90-100'ü pozitif reaksiyon, -: suşların % 90-100'ü negatif, +/-: suşların % 61-89'u pozitif reaksiyon, d: suşların % 40-60'ı pozitif reaksiyon, w: zayıf.

Selektif besiyerlerine egg-yolk ilavesi lesitinaz aktivitesine sahip olmayan *C. difficile*'yi lesitinaz pozitif *Clostridium* türlerinden (örn.; *C. perfringens*, *C. bifermantans*) ayırmak için kullanılmakta olan önemli bir ayrıntıdır (41). Uygun besiyerinde gelişen *C. difficile* kolonileri 365 nm dalga boyunda UV-ışığında yeşilimsi sarı floresan özellik göstermektedirler (16,19).

SONUÇ

C. difficile'ye bağlı ishal vakalarının, oldukça fazla sayıda karşımıza çıktığı günümüzde, *C. difficile*'in çiftlik hayvanlarının gastrointestinal sisteminden başka çeşitli kaynaklardan (örn.; toprak, sular ve çeşitli gıdalar) da tespit edildiği bilinmektedir.

C. difficile'in gıdalardan insanlara bulaşması ile ilgili kesin bir bilgi olmamakla birlikte *C. difficile* sporlarının hayvanın kas ve diğer dokularına kesim sonrasında fekal ve çevresel kontaminasyon sonucu

bulaşması, gıda üretim süreci boyunca da canlılığını koruması hayvansal gıdaların enfeksiyon kaynağı olabileceğini düşündürmektedir. *C. difficile*'in çiğ sebze ve salatalardan, topraktan ve çevresel numunelerden de izole edilmesi, çevrede yaygın olarak bulunduğunu göstermekte ve enfeksiyonun yayılmasında gıdaların kaynak oluşturabileceği ihtimalini arttırmaktadır.

Sonuç olarak, *C. difficile*'in gıdalar vasıtasıyla bulaşma ihtimali etken ve toksinlerinin gıda ortamlarında varlıklarının belirlenmesi, gıdalardan izole edilen suşlarla, klinik suşların benzerliklerinin ortaya konulması ve bu konuda alınması gereken tedbirlerin araştırılmasına yönelik yapılacak bilimsel çalışmalar sonucunda daha iyi anlaşılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Cartman ST., Heap JT., Kuehne SA., Cockayne A., Minton NP., 2010. The emergence of

- 'hypervirulence' in *Clostridium difficile*. Int J Med Microbiol, 300, 387-395.
2. Barbut F., Petit JC., 2001. Epidemiology of *Clostridium difficile*-associated infections. Clin Microbiol Infect, 7, 405-410.
 3. Weese JS., 2010. *Clostridium difficile* in food-innocent bystander or serious threat? Clin Microbiol Infect, 16, 3-10.
 4. Kıyan M., 1999. Anaerop, sporlu, gram pozitif basiller. In "Temel ve Klinik Mikrobiyoloji", Ed., Ustaçelebi Ş., 1st ed., 645-649, Güneş Kitabevi, Ankara.
 5. Kelly CP., LaMont JT., 2008. *Clostridium difficile* - More difficult than ever. N Engl J Med, 359, 1932-1940.
 6. Karadağ FY., 2013. *Clostridium difficile*. Ekmud Bilimsel Platformu. 20-24 Mart 2013, Antalya, 32-33.
 7. Rainey FA., Hollen BJ., Small A., 2015. Clostridium, In "Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria", 1-43, Online, John Wiley & Sons, Inc. in association with Bergey's Manual Trust.
 8. Vedantam G., Clark A., Chu M., McQuade R., Mallozzi M., Viswanathan VK., 2012. *Clostridium difficile* infection: Toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes, 3, 121-134.
 9. Rupnik M., Dupuy B., Fairweather NF., Gerding DN., Johnson S., Just I., Lysterly DM., Popoff MR., Rood JL., Sonenshein AL., Thelestam M., Wren BW., Wilkins TD., Eichel-Streiber C., 2005. Revised nomenclature of *Clostridium difficile* toxins and associated genes. J Med Microbiol, 54, 113-117.
 10. Lawley TD., Croucher NJ., Yu L., Clare S., Sebahia M., Goulding D., Pickard DJ., Parkhill J., Choudhary J., Dougan G., 2009. Proteomic and genomic characterization of highly infectious *Clostridium difficile* 630 spores. J Bacteriol, 191, 5377-5386.
 11. Cookson B., 2007. Hypervirulent strains of *Clostridium difficile*. Postgrad Med J, 83, 291-295.
 12. Sinh P., Barrett TA., Yun L., 2011. *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease: a review. Gastroenterol Res Pract, 11.
 13. Kılıç A., 2013. *Clostridium difficile* enfeksiyonu: Epidemiyoloji, risk faktörleri, patogenezi, klinik özellikler, tanı ve tedavi. Mikrobiyol Bul, 47, 556-566.
 14. Pelaez T., Alcalá L., Alonso R., Rodríguez-Creixems M., García-Lechuz JM., Bouza E., 2002. Susceptibility to metronidazole and reassessment of *Clostridium difficile* vancomycin. Antimicrob Agents Ch, 46, 1647-1650.
 15. Dworzynski A., Sokol B., Meisel-Mikolajczyk F., 1991. Antibiotic resistance of *Clostridium difficile* isolates. Cytobios, 65, 149-153.
 16. Jöbstl M., Heuberger S., Indra A., Nepf R., Köfer J., Wagner M., 2010. *Clostridium difficile* in raw products of animal origin. Int J Food Microbiol, 138, 172-175.
 17. Metcalf DS., Costa MC., Dew WMV., Weese JS., 2010. *Clostridium difficile* in vegetables, Canada. Lett Appl Microbiol, 51, 600-602.
 18. Bakri MM., Brown DJ., Butcher JP., Sutherland AD., 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emerg Infect Dis, 15, 817-818.
 19. Simango C., Mwakurudza S., 2008. *Clostridium difficile* in broiler chickens sold at market places in Zimbabwe and their antimicrobial susceptibility. Int J Food Microbiol, 124, 268-270.
 20. Planche T., Arnold A., 2009. *Clostridium difficile*. Medicine, 37, 641-643.
 21. Wilson BA., Salyers AA., Whitt DD., Winkler ME., 2011. Bacterial Pathogenesis: A Molecular Approach. 3rd ed., 423-431, ASM Press, Washington.
 22. McFee RB., Abdelsayed GG., 2009. *Clostridium difficile*. Dis Mon, 55, 439-470.
 23. Rupnik M., 2010. *Clostridium difficile*: (Re)emergence of zoonotic potential. Clin Infect Dis, 51, 583-584.
 24. Leffler DA., Lamont JT., 2015. *Clostridium difficile* Infection. N Engl J Med, 372, 1539-1548.
 25. Leclair MA., Allard C., Lesur O., Pepin J., 2010. *Clostridium difficile* infection in the intensive care unit. J Intensive Care Med, 25, 23-30.
 26. Gordon D., Young LR., Reddy S., Bergman C., Young JD., 2016. Incidence of *Clostridium difficile* infection in patients receiving high-risk antibiotics with or without a proton pump inhibitor. J Hosp Infect, 92, 173-177.
 27. Broda DM., DeLacy KM., Bell RG., Braggins TJ., Cook RL., 1996. Psychrotrophic *Clostridium spp.*

- associated with 'blown pack' spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings. *Int J of Food Microbiol*, 29, 335-352.
28. Eckert C., Burghoffer B., Barbut F., 2013. Contamination of ready-to-eat raw vegetables with *Clostridium difficile* in France. *J Med Microbiol*, 62, 1435-1438.
 29. Rodriguez C., Korsak N., Taminiau B., Avesani V., Van Broeck J., Brach P., Delmee M., Daube G., 2015. *Clostridium difficile* from food and surface samples in a Belgian nursing home: An unlikely source of contamination. *Anaerobe*, 32, 87-89.
 30. Rahimi E., Afzali ZS., Baghbadorani ZT., 2015. *Clostridium difficile* in ready-to-eat foods in Isfahan and Shahrekord, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 5, 128-131.
 31. Esfandiari Z., Weese S., Ezzatpanah H., Jalali M., Chamani M., 2014. Occurrence of *Clostridium difficile* in seasoned hamburgers and seven processing plants in Iran. *BMC Microbiology*, 14, 283.
 32. Metcalf D., Avery BP., Janecko N., Matic N., Reid-Smith R., Weese JS., 2011. *Clostridium difficile* in seafood and fish. *Anaerobe*, 17, 85-86.
 33. Montazeri N., Liu D., Janes ME., 2015. Occurrence of toxigenic *Clostridium difficile* in Louisiana Oysters (*Crassostrea virginica*) and environmental waters. *Food Nutr Sci*, 6, 1065-1070.
 34. Rodriguez-Palacios A., Staempfli HR., Duffield T., Weese JS., 2007. *Clostridium difficile* in retail ground meat, Canada. *Emerg Infect Dis*, 13, 485-487.
 35. Weese JS., Reid-Smith RJ., Avery BP., Rousseau J., 2010. Detection and characterization of *Clostridium difficile* in retail chicken Lett. *Appl Microbiol*, 50, 362-365.
 36. Drigo I., Mazzolini E., Bacchin C., Tonon E., Puiatti C., Bano L., Spigaglia P., Barbanti F., Agnoletti F., 2015. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Clostridium difficile* isolated from rabbits raised for meat production. *Vet Microbiol*, 181, 303-307.
 37. Boer E., Zwartkruis-Nahuis A., Heuvelink AE., Harmanus C., Kuijper EJ., 2011. Prevalence of *Clostridium difficile* in retailed meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol*, 144, 561-564.
 38. Güran HS., İlhak Ol., 2015. *Clostridium difficile* in retail chicken meat parts and liver in the Eastern Region of Turkey. *J Verbr Lebensm*, 10, 359-364.
 39. Rahimi E., Jalali M., Weese JS., 2014. Prevalence of *Clostridium difficile* in raw beef, cow, sheep, goat, camel and buffalo meat in Iran. *BMC Public Health*, 14, 119.
 40. Songer JG., Trinh HT., Killgore GE., Thompson AD., McDonald LC., Limbago BM., 2009. *Clostridium difficile* in retail meat products, USA, 2007. *Emerg Infect Dis*, 15, 819-821.
 41. Brazier JS., 1998. The diagnosis of *Clostridium difficile*-associated disease. *J Antimicrob Chemother*, 41, 29-40.
 42. Selmer T., Andrei PI., 2001. p-Hydroxyphenylacetate decarboxylase from *Clostridium difficile*. A novel glycol radical enzyme catalysing the formation of p-cresol. *Eur J Biochem*, 268, 1363-1372.
 43. Yıldız F., Gücükoğlu A., 2012. *Clostridium difficile* ve gıda güvenliği açısından önemi. *Elektronik Mikrobiyoloji Derg*, 10, 22-29.
 44. Fedorko DP., Williams EC., 1997. Use of cycloserine-cefoxitin-fructose agar and L-proline-aminopeptidase (PRO Discs) in the rapid identification of *Clostridium difficile*. *J Clin Microbiol*, 35, 1258-1259.

YAZARLARA BİLGİ

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Nisan, Ekim ve Aralık aylarında olmak üzere yılda 3 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi "Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg." dir.
2. Bu dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış Temel Veteriner Bilimleri (Anatomi, Biyokimya, Fizyoloji, Histoloji, Mesleki Etik ve Deontoloji), Klinik Öncesi Veteriner Bilimleri (Farmakoloji ve Toksikoloji, Mikrobiyoloji, Parazitoloji, Patoloji, Viroloji), Klinik Veteriner Bilimleri (İç Hastalıkları, Cerrahi, Doğum ve Jinekoloji, Dölerme ve Suni Tohumlama), Zootekni ve Hayvan Besleme Bilimleri (Biyostatistik, Genetik, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları, Hayvancılık İşletme Ekonomisi, Zootekni), Hayvansal Orjinli Gıda Hijyeni ve Teknolojisi, Egzotik Hayvanlar Bilimi ve Laboratuvar Hayvanları Bilimi alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve davetli veya editörün onayı alınmış derlemeler yayımlanır.
3. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi'ne yayımlanması amacıyla gönderilen makale ile ilgili olarak; yazarlar gerekli olan (klinik, deneysel çalışmalar vb.) etik kurulu onayı aldıkları kurum ve onay numarasını makalenin Materyal ve Metot kısmına yazmalıdırlar. Yayın kurulu eğer isterse etik kurul onay belgesini isteyebilir.
4. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)ına aittir.
5. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nca belirtilen "İhbarı Mecburi Hastalıklar" ile ilgili makalelerin değerlendirmeye alınabilmesi için T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'ndan alınmış izin yazısının Dergi Editörlüğüne sunulması zorunludur.
6. Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makalenin yayına kabulü, hakemlerin ve dergi editörlüğünün kararına bağlıdır.
7. Sorumlu yazar Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisine yayımlanmak üzere göndereceği makale ile birlikte "**Makale Kontrol Formu**"nu da göndermek zorundadır.
8. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi' ne gönderilen makalelerde, makale değerlendirme süreci başladığı andan itibaren, makalede yazar ismi değişikliği ve isim sıralaması değişikliği yapılmaz.
9. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Editörlüğüne ulaşan makale ve makale kontrol formu, dergi editörlüğünce ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. Makaleler, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, şekil, tablolar ve kaynaklarda dahil olmak üzere sayfa sayısı orijinal bilimsel araştırmalarda ve derlemelerde 16, olgu sunumu gibi kısa bilimsel çalışmalarda ise 5 sayfayı geçmemelidir.
2. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır.
3. Makaleye satır numaraları (makalenin 2. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) ve sayfa numaraları (sayfa altında ve ortalı) eklenmelidir.
4. Makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje, vb.) makale başlığının sonuna üst simge olarak * işareti konulup makale başlığı altında italik yazıyla açıklanmalıdır.
5. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

Orijinal Bilimsel Araştırma Makaleleri İçin:

Birinci Sayfa: makalenin birinci sayfası başlık, yazar isimleri ve adresleri, yazarların e-posta adresleri, sorumlu yazar iletişim bilgileri ve eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiden oluşmalıdır.

Başlık: Türkçe ve İngilizce başlıklar sadece ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Makalenin dili Türkçe ise önce Türkçe sonra İngilizce başlık, makalenin dili İngilizce ise önce İngilizce sonra Türkçe başlık yazılmalıdır.

Yazar İsimleri ve Adresleri: Yazar(lar)'ın adı ve soyadının (akademik ünvanlı) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortalı gelecek şekilde yazılmalıdır. Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ üst köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve Ülke belirtilmelidir.

Yazarların e-posta Adresleri: makalede ismi bulunan tüm yazarların ismi ve e-posta adresleri yazılmalıdır.

Sorumlu Yazar İletişim Bilgileri: Makalenin sorumlu yazarına ait isim-soyisim, e-posta, adres, telefon, GSM ve fax numaralarını içeren bilgiler yazılmalıdır.

Makale ile İlgili Açıklayıcı Bilgi: Eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje vb.) birinci sayfanın sonunda italik yazıyla açıklanmalıdır.

İkinci Sayfa: Makalenin ikinci sayfası Türkçe özet ve anahtar kelimeler ile İngilizce özet ve anahtar kelimeleri içermelidir. Makale yazım dili Türkçe ise öncelikli olarak Türkçe özet ve anahtar kelimeler; eğer makale yazım dili İngilizce ise öncelikli olarak İngilizce özet ve anahtar kelimeler sunulmalıdır.

Özet: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Anahtar kelimeler “Türkiye Bilimleri Terimleri” nden seçilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com/tr-index.html>). En fazla 5 adet olmalıdır. Türkçe anahtar kelimeler Türkçe’ye göre, İngilizce anahtar kelimeler İngilizce’ye göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Her anahtar kelime arasına (,) işareti konulup, sonuncu anahtar kelimedenden sonra (.) işareti konulmalıdır.

Üçüncü Sayfa: Makale üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “MATERYAL ve METOT”, “BULGULAR”, “TARTIŞMA ve SONUÇ” ve “KAYNAKLAR” bölümleri halinde tamamlanmalıdır. Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, teşekkür de eklenebilir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır. Bölümlere ait alt başlıklar yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Tüm başlıklar koyu tonda ve 12 punto ile satırbaşı hizasında yazılmalıdır.

İstatistiksel Analiz bilgileri: makalenin MATERYAL ve METOT bölümünün sonunda “İstatistiksel Analiz” başlığı altında verilmelidir.

Birimler ve Kısaltmalar: Her bir kısaltmanın açılımı metinde ilk geçtiği yerde verilmelidir. Birimler ve ölçülerde Uluslar Arası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri italik olarak yazılmalıdır. Makale içerisinde kullanılan rakamsal ve istatistiksel verilerde nokta kullanılmalıdır (örnek: 44.5; 0.82; % 97.7; $P < 0.01$ vb.).

Tablo ve Şekiller: Tablo ve Şekiller ana dökümandan ayrı olarak gönderilmelidir. Tablolar Dikey sayfa olanlar genişlik 7 cm’ye sığacak şekilde en fazla 35 satır, yatay sayfaya 15 cm’ye sığacak şekilde en fazla 25 satır olmalıdır. Şekiller bulanık olmayacak şekilde, jpeg, tiff, bmp veya gif formatında ve en az 150 dpi çözünürlükte hazırlanmalı, şekil üzerine yazılan yazılar ve işaretlemeler aynı şekilde resim işleme programlarında (Photoshop, paint vs.) “Calibri” fontu ile 12 puntoyu geçmemesi gerekmektedir. Grafikler resim formatında değil doc, docx, xls veyaxlsx formatında hazırlanmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde Şekil olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1). Tablo ve şekillerin başlık ve açıklamaları hem Türkçe hemde İngilizce olarak eklenmelidir. Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü kısaltma tablo ve şekil altında açıklanmalıdır.

Sonuç: Makaleye ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Olgu Sunumları İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 120’den daha az olmamalı ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Üçüncü sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “OLGU SUNUMU” (olgu sunumu başlığı altında materyal, metot ve bulgulardan bahsedilmelidir) “TARTIŞMA ve SONUÇ” ve “KAYNAKLAR” şeklinde tamamlanmalıdır.

Olgu sunumu içerisinde eğer varsa İstatistiksel analiz bilgileri, birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Olgu sunumuna ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Derlemeler İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Derlemeler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Derleme üçüncü sayfadan itibaren GİRİŞ ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, SONUÇ ve KAYNAKLAR ile tamamlanmalıdır.

Derleme içerisinde eğer varsa birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Derlemeye ait sonuç, KAYNAKLAR bölümünden hemen önce SONUÇ başlığı altında belirtilmelidir.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi’ne yayımlanmak üzere gönderilen derlemenin sorumlu yazarının derlemenin konusu ile ilgili en az 3 (üç) adet makalesinin olması gerekmektedir. Sorumlu yazar, derlemesini gönderirken konu ile ilgili makalelerinin de künye bilgilerini dergi editörlüğüne göndermelidir (makale künyeleri, makale metninin en son sayfasında sunulmalıdır)

Kaynaklar

Kullanılan kaynak sayısı olgu sunumları için 10’dan az, araştırma makaleleri için 20’den az ve tüm makale türleri için 45’den fazla olmamalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kullanılan kaynakların (makalenin gönderildiği yıl baz alınarak) en az üçte birlik kısmı son 3 yıla ait olmalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kaynaklar aşağıda belirtildiği şekilde sunulmalıdır:

Metin içerisinde:

Metin içerisinde kaynaklara 1’den başlamak üzere numara verilmelidir ve bu numaralar (1), (1,2), (1,4-7,13) şeklinde parantez içerisinde belirtilmelidir. Yazar isminin

kullanılacağı yerlerde ise yazarın soyadı ve parantez içerisinde kaynağın numarası Aktaş (22), Aktaş ve ark. (13) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

Kaynaklar Bölümünde:

Metin içerisinde numaralandırılan kaynaklar, makalenin kaynaklar bölümünde numaralarına göre sıralandırılmalıdır.

Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin isminin kısaltması kullanılmalıdır.

Kaynak makale ise; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun*, 69, 4657-4660.

Kaynak kitap ise; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

Kaynak kitapta bir bölüm ise; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In “Textbook of Veterinary Internal Medicine”, Ed., SJ Ettinger, 6th ed., 230-250, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kaynak bir tez ise; Aktaş MS., 2005. Köpeklerde antibiyotiklerin neden olduğu ishallerde probiyotiklerden *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Kaynak bir kuruluşun yayını ise; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

Kaynak bir yazılım ise; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.

Web tabanlı kaynaklar kullanılmamalıdır.

MAKALENİN GÖNDERİLMESİ

Makale online sistem (<http://dergipark.gov.tr/ataunivbd>) aracılığıyla dergi editörlüğüne gönderilmelidir.

DERGİ BASKISI

Kabul edilen çalışmalar **ücretsiz** basılacaktır.

Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

Sorumlu yazara makalenin basıldığı sayıdan bir örnek ücretsiz olarak gönderilir.

2018 yılından itibaren, derginin baskısı siyah-beyaz olarak yapılacaktır. Makalelerinde renkli resim/figür/şekil bulunan yazarlar, renkli baskı istemeleri halinde, gerekli ücreti ödemeleri halinde bu istekleri yerine getirilecektir.

Bu yazım kuralları, Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi Yayın Kurulu tarafından revize edilmiştir. 01.01.2018 tarihinden sonra gönderilecek makaleler bu kurallara tabidir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

- 1.** Atatürk University Journal of Veterinary Sciences is a refereed scientific publication organ of Atatürk University Faculty of Veterinary Sciences and is published tri-annually in April, October and December. The abbreviation of the journal's title is "Atatürk University J. Vet. Sci."
- 2.** Original research papers, case reports and invited or Editor-approved reviews to be submitted should be prepared either in Turkish or in English, must not be published elsewhere or submitted concomitantly to any other journal, within the scope of Veterinary Medicine and relevant Departments, i.e. Basic Veterinary Sciences (Anatomy, Biochemistry, Physiology, Histology, Occupational/Professional Ethics and Deontology), Preclinical Veterinary Sciences (Pharmacology and Toxicology, Microbiology, Parasitology, Pathology, Virology), Clinical Veterinary Sciences (Surgery, Internal Medicine, Obstetrics and Gynecology, Reproduction and Artificial Insemination), Animal Science and Nutritional Sciences (Biostatistics, Genetics, Animal Nutrition and Nutritional Disorders, Animal Enterprises Economy, Animal Science), Animal-Originated Food Hygiene and Technology, with, exotic animal science and laboratory animals, are published in this journal.
- 3.** Ethics committee approval (clinical, experimental, etc.), institution, and approval number are required for the article sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must be specified in the Material and Method section of the article. The editorial board may also request an ethics committee approval document when deemed necessary.
- 4.** Authors are responsible for complying with the copyright conditions related with the material cited (taken) from other resources or used and signing the agreement contract declaring transfer of the copyright to the journal. The full responsibility of the texts to be appeared within the journal belongs to the author(s).
- 5.** Manuscripts to be considered are sent to the two referees at least. Acceptance of the manuscripts depends on both suggestion of the referees and final decision of the Editorial Board.
- 6.** The responsible author has to send the "Article Check List" along with the article to be sent to Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication.
- 7.** We will not be able to make any changes to the author names (adding/removing authors, change of order of authors) at the article send to Atatürk University Journal of Veterinary Science from the moment the paper evaluated process begins
- 8.** Article and article check list reaching Atatürk University Journal of Veterinary Sciences Editor is subject to preliminary evaluation by a journal editor. The editorial has the right to refuse the article according to the preliminary evaluation result or to request a correction before subjecting it to the referee evaluation.

MANUSCRIPT PREPARATION

1. Manuscripts should be written in A4-sized paper (one-sided), double-spaced, with 3 cm space from the margins of the paper and should not exceed 16 pages for original scientific researches and reviews or 5 pages for short scientific studies such as case reports.
2. Manuscript should be prepared using Microsoft Word 6.0 or upper versions, in Calibri characters with 12 point typing size.
3. Line numbers (be started from the 2nd page onwards) and page numbers (at the middle of the bottom of the page) should be given in the manuscript.
4. Details (thesis, project, etc.) related with the manuscripts should be given at the end of the title of the manuscript with the sign of superscript (*) with further explanation below the title in italic format.
5. Trademarks of substances (materials) and products of the subject of the study should not be used.

For Research Articles:

First page: The first page of the manuscript should contain title, authors' name-surname and addresses, e-mail addresses of the authors, corresponding authors' explanatory details related with the manuscripts, if any.

Title: Titles in Turkish and English should be written in small letters with only the first letter to be in capital. In case of the Turkish language of the main text, firstly titles in Turkish then in English should be given, while the opposite should be given for manuscripts written in English.

Names of authors and addresses: The first letters of name and surnames (without academic titles) of author(s) should be written in capital and aligned at the middle below the title. Corresponding author (*) should be pointed, a value should be added as a superscript at the right and these values should be used in the section of addresses. In that section, the body/authority, unit/department, city and country of the authors should be described.

E-mail addresses of the authors: All the names and e-mail addresses of authors mentioned within the manuscript should be written.

Contact details of the corresponding author: The name-surname, e-mail, address, phone, mobile and fax numbers of the corresponding author should be written.

Explanatory details of the manuscripts: If any, the explanatory details (thesis, project, etc.) should be written in *italic* letters at the end of the first page.

Second page: The second page of the manuscript should contain summary in Turkish and English with key words each. If the language of the main text is in Turkish, the summary and

the key words should first be in Turkish while the opposite should be given for those manuscripts written in English.

Summary: Briefly, it should contain the aim, material, method, results and conclusions. The number of word to be used should be between 170-200 words and be written in single-space.

Key words: The number should be 5 at maximum in the alphabetic order of the language used either in Turkish or in English. Between each of the words, a comma (,) sign should be put while a full stop (.) sign should be put at the end of the last one.

Third page: From this page onwards, the manuscript should continue with the sections of INTRODUCTION, MATERIALS and METHODS, RESULTS, DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES in the following order. The sections of results and discussion may be given together. A section of acknowledgement may also be added, if needed. Section titles should be written in capital letters. Sub-headings of the sections should be written with the first letters in capital only and aligned with the beginning of paragraph. All the headings should be written in black 12-point typing-size and aligned with the beginning of paragraph.

Data from Statistical analyses: This section should be given at the end of MATERIALS and METHODS section and under the title of “Statistical Analysis”.

Units and Abbreviations: The meaning of each abbreviation should be given where it appears first. For units and measurements, International Standard units (SI-system) should be used. The names of genus (breeds) and species should be written in italic style. For numerical and statistical values, full stop (.) sign should be used (e.g. 44.5; 0.82; 97.7 %; $P < 0.01$, etc.).

Tables and Figures: Figures, graphics, photos and pictures/plates within the headings and text should all be given as Figure. Figures and tables should be numbered according to their orders within the text and written without any abbreviation within the paragraph (e.g. Figure 1, Table 1). Tables and figures should be placed into the sections appropriately, and their headings and explanations should also be included in Turkish and English. All types of abbreviations used within tables and figures should be explained below them.

Conclusion: The ultimate result obtained should be described as “In conclusion,…” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Case Reports:

The first and second pages should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The number of words to be used in summary should not be less than 120 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, INTRODUCTION, CASE REPORT (materials, methods and results should be mentioned under the title of case report) should be followed by DISCUSSION and CONCLUSION and REFERENCES.

If any, data from the statistical analysis, units and abbreviations, tables and figures should be presented as given for scientific research manuscripts.

For case report, the ultimate result obtained should be described as “In conclusion,...” in a single paragraph at the end of DISCUSSION and CONCLUSION section.

For Reviews:

The first and second pages of reviews should be prepared according to details given for the scientific research manuscripts. The summary should involve data on the subject and aim of the review. The number of words used in summary should be between 170-200 words and be written in single-spaced type.

From the third page onwards, reviews should start with introduction, continue with subheadings to be determined by the author(s) and be completed with CONCLUSION and REFERENCES.

If any, the units and abbreviations, tables and figures within the review should be presented as given for scientific research manuscripts.

For reviews, the ultimate result should be described as CONCLUSION section in a single paragraph just before the section for REFERENCES.

The corresponding author of the compilation sent to the Atatürk University Journal of Veterinary Sciences for publication must have at least 3 articles on the subject of the compilation. The corresponding author must send the citation information of relevant articles related to the subject along with his/ her article (relevant article citations must be presented on the last page of the article)

References

The number of resources used must not be less than 10 for case reports, less than 20 for research articles, and more than 45 for all article types.

Regardless of the type of article (original research article, case report, compilation), at least one-third of the resources used (based on the year the article was submitted) must belong to the last three years.

Regardless of the type of manuscript (original research paper, case report, review), references should be given, as follows:

For Text section:

Within the text, reference numbers should be given as numbers starting from 1, and these numbers should be indicated within the brackets as (1), (1,2), and/or (1,4-7,13). Where the name of the author is to be given, the surname of the author and reference number should be written as Aktas (22), and/or Aktas et al. (13).

For References section:

The references given within the text should be given as numbers in numerical order within the reference section.

For writing the scientific journals, its international title recommended by the journal should be used. The journal title abbreviation must not be used.

For manuscripts; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infection and Immunity*, 69, 4657-4660.

For books; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th edn., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

For chapters of a book; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In “Textbook of Veterinary Internal Medicine”, Ed., SJ Ettinger, 6th edn., 230-250, W.B. Saunders Co., Philadelphia.

For theses; Aktas MS., 2005. Efficacy of *Saccharomyces Boulardii* as a probiotic in Dogs with lincomycin induced diarrhoea. Ankara University, Graduate School Health Science, Turkey.

For publications of a Foundation; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

For softwares; SAS, 1990. SAS user’s guide: Statistics, 4th edn., SAS Institute, Cary.

Web-based references should not be used.

MANUSCRIPT SUBMISSION

The article must be sent to the journal editor through online system (<http://dergipark.ulakbim.gov.tr/ataunivbd/>).The file names of original manuscripts and tables should involve a “.doc” extension.

Figures (graphs, photos, figures and pictures/plates) should be submitted, as a separate file, in JPEG format with 300 DPI resolutions.

JOURNAL’S PRESS

Articles accepted for publication will be published free of charge.

No offprints will be sent to the authors.

A copy of the issue of the journal with the article is sent for free to the corresponding author of the article.

From 2018 on, the print of the journal will be done in black and white. Authors who have colored pictures / figures / figures in their articles, in the case of color printing requests, this demand will be fulfilled in case of payment of the necessary fee.

These spelling rules was revised by Ataturk University Journal of Veterinary Sciences Editorial Board. All of the articles send after01.01.2018 have to abide by the rules.

► Muhamed KATICA, Indira MUJEZINOVIC, Nedžad GRADASCEVIC. Effects of Noradrenaline on Smooth Musculature of Small and Large Intestines of Fattening Turkey Under In Vitro Conditions (<i>Noradrenalinin In Vitro Koşullar Altında Besi Hindilerinde İnce ve Kalın Bağırsak Düz Kasları Üzerine Etkisi</i>)	257 - 265
► Necati UTLU, Şaban ÇELEBİ, Menekşe SOYDAN, Esra AKTAŞ ŞENOCAK. The Effects of Dietary Vitamin E and Organic Selenium on the Levels of Some Bioelements in Tissues of Laying Hens (<i>Diyetsel Vitamin E ve Organik Selenyumun Yumurta Tavuğu dokularındaki Bazı Biyoelement Düzeyleri Üzerine Etkileri</i>)	266 - 273
► Özgür Yaşar ÇELİK, Gülşah AKGÜL, Kıvanç İRAK. Investigation of Seroprevalence of Maedi-Visna and Caprine Arthritis Encephalitis in Sheep and Goats in Siirt Province (<i>Siirt İli Koyun ve Keçilerinde Maedi-Visna ve Caprine Arthritis Encephalitis Seroprevalansının Araştırılması</i>)	274 - 277
► Vural DENİZHAN, Kamile BİÇEK. Van İli ve Bazı İlçelerinde Koyunlarda <i>Fasciola hepatica</i> 'nın Seroprevalansı (<i>Seroprevalence of Fasciola hepatica in Sheep in the Province of Van and Some Districts</i>)	278 - 284
► Ahmet GEÇER, Nurhan ERTAŞ ONMAZ. Kanatlı Kesimi Aşamalarında E. Coli O157:H7 Varlığının IMS-PZR Yöntemleri ile İncelenmesi (<i>Investigation of Escherichia coli O157:H7 By IMS-PCR Techniques in Poultry Slaughtering Stages</i>)	285 - 292
► Sarper ÖZBEK, Adnan ŞEHU. Etlik Piliç Yemlerinde Metiyonin Kaynağı olarak 2-Hidroksi-4-(Metiltiy) Butanoik Asit Kullanımı (<i>Using 2-Hydroxy-4-(Methylthio) Butanoic Acid as a Source of Methionine in Broiler Diets</i>)	293 - 300
► Sedat TURGUT, Yasin PARLATIR, Hasan ERDOĞAN, Serdar PAŞA. Sağlıklı Koyunlarda Flunixin Meglumine ve Meloksikam Uygulamasının Koagülasyon Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması (<i>Investigation of the Effects of Flunixin Meglumine and Meloxycam Administration on Coagulation Profiles in Healthy Sheep</i>)	301 - 308
► Selim ÇOMAKLI, Yavuz Selim SAĞLAM, Mustafa ÖZKARACA, Serdar ALTUN. Erzurum Yöresinde Sığır Akciğerlerinde Parainfluenza-3 Viral Antijenlerinin İmmunohistokimyasal Yöntemlerle Belirlenmesi (<i>The Determination of Parainfluenza-3 Viral Antigens Using Immunohistochemical Methods in Cattle Lungs in Erzurum Region</i>)	309 - 316
► Nusret APAYDIN, Hüseyin ERMİN. Dişi Köpeklerde İdrar Kesesi Hastalıklarının Radyografik, Ultrasonografik ve Endoskopik Yöntemlerle Belirlenmesi (<i>Determination of Methods Radiographic, Ultrasonographic and Endoscopic of Urinary Bladder Diseases in Female Dogs</i>)	317 - 325
► Emin ŞENGÜL, Fikret ÇELEBİ, Ali ÇINAR. <i>Achillea millefolium</i> (Civanperçemi) Ekstraktı ve Luteolin'in İn Vitro Rat Mesanesi Düz Kas Kontraksiyonları Üzerine Etkileri (<i>The Effects of Achillea millefolium (Yarrow) Extract and Luteolin on In Vitro Rat Urinary Bladder Muscles</i>)	326 - 336
► Volkan GELEN, Emin ŞENGÜL, Serkan YILDIRIM, Fikret ÇELEBİ, Ali ÇINAR. Ratlarda Cyclophosphamide ile İndüklenen Hemorajik Sistitte Mesane Kontraktilitesi ve Histopatolojisi Üzerine Rutin'in Etkileri (<i>Effects of Rutin on Bladder Contractility and Histopathology in Cyclophosphamide-Induced Hemorrhagic Cystitis in Rats</i>)	337 - 346
► Mehmet Ali TEMİZ, Atilla TEMUR. Bakır Nefrotoksitesinde Melatonin ve E Vitamini'nin Antioksidan Parametreler Üzerine Etkileri (<i>The Effects of Melatonin and Vitamin E on Antioxidant Parameters in Copper Nephrotoxicity</i>)	347 - 354
► Cavit ARSLAN, Tuncay TUFAN. Kars İlindeki Süt İneklerinin Kış Dönemindeki Besleme İlkeleri (<i>Winter Feeding Principles of Dairy Cows in Kars Province</i>)	355 - 363
Derlemeler / Reviews	
► Zeynep ÖZDEMİR, Bünyamin TRAŞ. Behaviours of Drugs in the Milk - A Review (<i>İlaçların Sütteki Davranışları - Derleme</i>)	364 - 372
► Efe KURTDEDE, Mert PEKCAN, Hilal KARAGÜL. Florun Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres ile İlişkileri (<i>Free Radicals, Reactive Oxygen Species and Relationship with Oxidative Stress</i>)	373 - 379
► Nihat TELLİ, Ahmet GÜNER. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis'in Süt ve Süt Ürünlerinde Tespit Yöntemleri (<i>Detection Methods of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Milk and Milk Products</i>)	380 - 388
► Zeynep ALATAŞ, Ahmet GÜNER. Clostridium difficile: Yeni Bir Gıda Patojeni mi? (<i>Clostridium difficile: Is it a New Food-Borne Pathogen?</i>)	389 - 396
Yıl / Year: 2018	Cilt / Volume: 13
Sayı / Issue : 3	