



November - 2019



VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yuzuncu Yil Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT

Van YYU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu

Kampus / Van - Turkey

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27

e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors (Editorial Board)

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)

Prof. Dr. Handan MERT (Proof & Quality Editor)

Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)

Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Section Editor)

Prof. Dr. Ozgur ISLEYICI (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Leyla MIS (Section and Technical Editor)

Assoc. Prof. Dr. Bekir OGUZ (Section and Electronic Journal Editor)

Assoc. Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)

Assist. Prof. Dr. Rabia Mehtap TUNCAY (Section Editor)

Publication Board

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ali CINAR (Univ. of Ataturk)

Prof. Dr. Abeer F. El Nahas (Alexandria, EGYPT)

Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)

Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)

Prof. Dr. Berrin SALMANOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Devrim S. AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Ehab Abu-Basha (Irbid, JORDAN)

Prof. Dr. Gert W NIEBAUER (Vienna, Austria)

Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)

Prof. Dr. Hasan Huseyin HADIMLI (Univ. of Selcuk)

Prof. Dr. James M. MAY (Nashville, TN, USA)

Prof. Dr. Kamil EKICI (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Logman ASLAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Nalan OZDAL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Oguz SARIMEHMETOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Tevhide SEL (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Ufuk Tansel SIRELI (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Volkan AKYOL (Univ. of Uludag)

Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Yeter DEGER (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Bahattin CAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Cristian Magdas (Cluj-Napoca, ROMANIA)

Assoc. Prof. Dr. Cumali OZKAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Feraye Esen GURSEL (Univ of Istanbul-Cerrahpasa)

Assoc. Prof. Dr. Hasan Huseyin ARI (Univ. of Cumhuriyet)

Assoc. Prof. Dr. Yildiray BASBUGAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Ali Rıza BABA OGLU (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

Dr. Omar ATROOZ (Mutah, JORDAN)

Scientific Board of This Issue

Assoc. Prof. Dr. Davut BAYRAM (Univ. of Erciyes)

Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Memiş BOLACALI (Univ. of Siirt)

Assoc. Prof. Dr. Zafer CANTEKIN (Univ of Mustafa Kemal)

Assoc. Prof. Dr. Seyda CENGİZ (Univ. of Ataturk)

Assist. Prof. Dr. Gamze CAKMAK (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Nebi CETİN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Yeter DEGER (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Banu DOKUZEYLUL (Univ. of Istanbul-Cerrahpasa)

Prof. Dr. Hasan EREN (Univ. of Adnan Menderes)

Assoc. Prof. Dr. Kadir KARAKUS (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Ufuk MERCAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Serpil NALBANTOGLU (Univ. of Ankara)

Prof. Dr. Huseyin NURSOY (Univ. of Bingol)

Assist. Prof. Dr. Turan YAMAN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. Semih YAŞAR (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Asli CILINGIR YELTEKIN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Bestami YILMAZ (Univ. of Harran)

This journal is published three times a year

All articles in this journal are available free of charge from <http://dergipark.gov.tr/vanvetj>

Year	Volume	Issue
2019	30	3

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, COSMOS IF, TUBITAK-ULAKBIM, Turkiye Atif Dizini and Google Scholar



Determination of *in vitro* True Digestibilities of Different Rates of Vetch Hay and Alfalfa Hay with Caramba

Hilmi ÇELİK¹ Zehra SELÇUK²

¹ Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Boyabat Directorate of Province Agriculture and Forestry, Sinop, Turkey

² Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Samsun, Turkey

Received: 05.11.2018

Accepted: 07.10.2019

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the effects of the mixing of either vetch or alfalfa with caramba on *in vitro* true dry matter digestibility for ruminants. The forage mixtures were formed in that caramba hay (100%), vetch hay (100%), alfalfa hay (100%), vetch hay+caramba hay (75+25%), vetch hay+caramba hay (50+50%), vetch hay+caramba hay (25+75%), alfalfa hay+caramba hay (75+25%), alfalfa hay+caramba hay (50+50%), alfalfa hay+ caramba hay (25+75%). The filter bags containing forage mixtures, buffer solutions and rumen fluid were prepared as described for Ankom Daisy *in vitro* fermentation system. Buffer solutions, rumen fluid and the filter bags containing samples were added to digestion units and incubated at 39 °C for 48 h. After incubation, the incubation medium inside of digestion units was removed and the filter bags gently washed until they were completely clean. Thereafter, neutral detergent fiber procedure was performed. *In vitro* true dry matter digestibility of caramba (74.35±1.18%) was significantly high, *in vitro* true dry matter digestibilities of vetch and alfalfa hays were similar to each other. There were increases ($P<0.05$) in *in vitro* true dry matter, organic matter and neutral detergent fiber digestibility values of forage mixtures with the increasing levels of caramba. Since forage mixtures formed by either vetch hay or alfalfa hay with caramba had higher digestibility values than those of vetch and alfalfa hays, this result may be attributed to a positive interaction between feeds.

Keywords: *In vitro* true digestibility, Vetch hay, Caramba hay, Alfalfa hay, Ruminant

ÖZ

Karambanın Fiğ Otu ve Yonca Otu ile Farklı Oranda Karışımlarının *in vitro* Gerçek Sindirilebilirliğinin Belirlenmesi

Yapılan bu çalışmanın amacı karambanın fiğ otu ve yonca otu ile farklı oranda karışımlarının ruminantlar için *in vitro* gerçek sindirilebilirliğinin belirlenmesidir. Araştırmada kaba yem karışımları karamba kuru otu (%100), fiğ kuru otu (%100), yonca kuru otu (%100), fiğ kuru otu+karamba kuru otu (%75+%25), fiğ kuru otu+karamba kuru otu (%50+%50), fiğ kuru otu+karamba kuru otu (%25+%75), yonca kuru otu+karamba kuru otu (%75+%25), yonca kuru otu+karamba kuru otu (%50+%50), yonca kuru otu+karamba kuru otu (%25+%75) olacak şekilde hazırlandı. Araştırmada kaba yem karışımlarını içeren filtre torbalar, tampon çözeltiler ve rumen sıvısı Ankom Daisy *in vitro* fermentasyon sistemi için tanımlanan şekilde hazırlandı. Sindirim üniteleri içerisine tampon çözeltiler, rumen sıvısı ve örnekleri içeren filtre torbalar eklendi ve 39 °C'de 48 saat inkübe edildi. Süre sonunda inkübasyon ortamı döküldü, filtre torbalar tamamen temizleninceye kadar yıkandı ve nötral deterjan fiber prosedürü uygulandı. Çalışmada karamba kuru otunun *in vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliği (%74.35±1.18) önemli derecede yüksek, fiğ ve yonca kuru otlarının *in vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirlikleri birbirlerine benzer bulundu. Karamba kuru otunun artan düzeylerde fiğ ve yonca kuru otlarıyla oluşturulan karışımlarının *in vitro* gerçek kuru madde, *in vitro* gerçek organik madde ve *in vitro* nötral deterjan fiber sindirilebilirlik değerlerinde artış saptandı ($P<0.05$). Fiğ kuru otu ve yonca kuru otunun karambayla oluşturulan karışımlarının sindirilebilirlik değerlerinin fiğ kuru otunun ve yonca kuru otunun bireysel sindirilebilirlik değerlerinden daha yüksek olmasının nedeni yemler arası pozitif bir etkileşime atfedilebilir.

Anahtar Kelimeler: *In vitro* gerçek sindirilebilirlik, Fiğ kuru otu, Karamba kuru otu, Yonca kuru otu, Ruminant

GİRİŞ

Kuru madde (KM)'de %18'den daha fazla ham selüloz (HS) ve %70'den daha az toplam sindirilebilir besin maddeleri içeren kaba yemler (Kellems ve Church 2002) herbivor rasyonlarının ana bileşeni olup, ruminantlarda balast madde ihtiyacının karşılanarak mekanik tokluğun sağlanmasında anahtar rol oynar. Kuru otlar, kuru kaba yemlerden olup, bitkinin vejetasyon dönemi sona ermeden biçilip kurutulmalarıyla elde edilir. Kültürü yapılan yem bitkilerine ait kuru otlar ağırlıklı olarak buğdaygiller ve baklagillerden elde edilir.

Karamba, ham protein (HP), nişasta gibi kolay fermente olabilen karbonhidratlar ve mineraller yönünden zengin, lezzetli, kolay sindirilebilir ve yılda birkaç kez biçilebilen bir buğdaygil yem bitkisi olan İtalyan çiminin bir varyetesidir (Kesiktaş 2010; Kusvuran ve Tansı 2011). Ruminant beslemede taze olarak, kurutulmuş ya da silolanarak kullanılabilmektedir (Bernard ve ark. 2002; Shao ve ark. 2005; Cooke ve ark. 2008). Kusvuran (2011) tarafından yürütülen bir araştırmada, karambanın HP değerinin %18.9, Kusvuran ve Tansı (2011) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise %15.2-16 arasında HP içerdiği bildirilmektedir. Özdeş ve ark. (2015) karamba kuru otunun nötral deterjan lif (NDF) ve asit deterjan lif (ADF) miktarlarını sırasıyla %59.08 ve 38.26 olarak bildirmektedir. Aynı araştırmada karamba kuru otunun kuru madde (KM) ve organik madde (OM) sindirilebilirliklerinin sırasıyla %79.58 ve 81.37 arasında olduğu ifade edilmektedir.

Kombinasyon halinde tüketilen kaba yem karışımlarının, bu kombinasyonda bulunan kaba yem maddelerinin ayrı ayrı tüketilmelerine göre besleme değerleri ve sindirilebilirlikleri daha yüksek (yemler arası pozitif etki) ya da daha düşük (yemler arası negatif etki) olabilmektedir (Niderkorn ve Baumont, 2009). Bu nedenle yem bitkilerinin besin madde bileşimlerinin yanı sıra ruminantlar tarafından ne ölçüde değerlendirilebilir olduklarının bilinmesi de önem taşır. Bu amaçla da yem bitkilerin ve karışımlarının sindirilebilirliklerine ilişkin araştırmalara gereksinim duyulmaktadır.

Yapılan bu çalışmanın amacı, karamba kuru otunun fiğ ve yonca kuru otlarıyla farklı düzeylerde oluşturulan karışımlarının yem bazında *in vitro* gerçek sindirilebilirliğinin (IVGS_{YEM}), *in vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliğinin (IVGKMS), kuru madde bazında *in vitro* gerçek organik madde sindirilebilirliğinin (IVGOMS_{KM}) ve kuru madde bazında *in vitro* nötral deterjan fiber sindirilebilirliğinin (IVNDFS_{KM}) belirlenmesidir.

MATERYAL ve METOT

Yem Materyali

Araştırmada yem materyali olarak kullanılan karamba, fiğ ve yonca kuru otları yaklaşık 2 cm uzunlukta olacak şekilde öğütüldü. Öğütülen kaba yem örneklerinden Tablo 1'de belirtilen şekilde karışımlar oluşturuldu. Ankom Daisy *in vitro* fermentasyon sistemine uyumlu her bir torbaya (F57) 1 mm'lik elekten geçirilen yem karışımları yaklaşık 0.5 g miktarında tartıldı ve torbaların ağızları sıcak mühürleme cihazı ile kapatıldı. Sindirilebilirlik tespiti her bir karışım için 8 tekrür olacak şekilde yürütüldü.

Kimyasal Analizler

Hazırlanan kaba yem karışımlarının KM, ham kül (HK) ve HP analizleri AOAC (2006)'ya göre yapıldı. Örneklerin ADF ve NDF içerikleri Ankom fiber analizler cihazı kullanılarak belirlendi.

Tablo 1. Kaba yem karışımları

Table 1. Forage mixtures

Karışımlar	Karamba %	Fiğ %	Yonca %
Karamba otu (KO)	100	0	0
Fiğ otu (FO)	0	100	0
Yonca otu (YO)	0	0	100
%75FO+%25KO	25	75	0
%50FO+%50KO	50	50	0
%25FO+%75KO	75	25	0
%75YO+%25KO	25	0	75
%50YO+%50KO	50	0	50
%25YO+%75KO	75	0	25

İn vitro Gerçek Sindirilebilirlik Tespiti

Ankom Daisy inkubator kullanılarak belirlenen *in vitro* sindirilebilirlik parametreleri için tampon solüsyonlar Ankom Daisy *in vitro* fermentasyon sistemi için önerildiği şekilde hazırlandı. Rumen içeriği Samsun İlinde faaliyet gösteren özel bir mezbahada (Florya Entegre Et Sanayi) kesime gelen ergin 2 adet erkek sığırdan alındı. Kesimi takiben yaklaşık 5 dk içerisinde her hayvanın rumeni açıldı. Rumenin farklı keselerinden olacak şekilde içerik daha önce 39 °C'ye getirilmiş ve CO₂ ilave edilmiş termos içerisine alındı ve hemen Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı Ruminant Yem Değerlendirme Araştırma ve Eğitim Ünitesine getirildi. Dört katlı sargı kullanılarak 39 °C'de CO₂'li ortamda süzülde. Rumen sıvısı pH değeri 6.35 olarak ölçüldü.

Hazırlanan tampon solüsyonların sıcaklığı 39 °C'ye getirildi. Tampon solüsyonlarından prosedürde belirtildiği miktarlarda alınarak 2 litrelik bir erlende karıştırıldı. İnkübatörün her sindirim ünitesi içerisine 1600 ml tampon solüsyon karışımı dolduruldu. Sindirim üniteleri inkübatöre yerleştirildi, sıcaklığı 39 °C'ye ulaşan sindirim ünitelerindeki tampon solüsyonun üzerine her sindirim ünitesi için 400 ml rumen sıvısı ilave edildi ve hazırlanan torbalar sindirim üniteleri içerisine yerleştirildi. Anaerobik ortamın devamlılığı için CO₂ gazı eklendi ve 48 saat süreyle inkübe edildi. İnkübasyon sonrası sindirim üniteleri içerisindeki inkübasyon ortamı dökülerek uzaklaştırıldı. Torbalar akan çeşme suyu altında tamamen temizleninceye kadar yıkandı. Yıkanan torbalar Ankom fiber analizler cihazına alındı ve NDF prosedürü uygulandı. Örneklerin IVGS_{YEM}, IVGKMS, IVGOMS ve IVNDFS_{KM} değerleri başlangıçta inkübe edilen miktar ve NDF prosedürünün sonrasındaki miktar arasındaki farktan hesaplandı.

İstatistik Analiz

Çalışmada elde edilen veriler aritmetik ortalamalar ve standart hatalar şeklinde özetlendi. Araştırmada kullanılan her bir yem karışımı için istatistiksel önem derecesi tek yönlü varyans analiziyle belirlendi. İstatistiksel farklılıkları belirlemek için Tukey Posthoc test uygulandı. İstatistik analizler için SPSS (2012) paket programı kullanıldı.

BULGULAR

Karamba, fiğ, yonca kuru otları ile karamba kuru otunun, farklı düzeylerde fiğ ve yonca kuru otlarıyla oluşturulan karışımlarının besin madde bileşimi Tablo 2'de, IVGOMSKM değerleri Şekil 1'de ve IVGSYEM, IVGKMS ve IVNDFS KM değerleri Tablo 3'de sunuldu. Araştırma sonuçlarına göre karamba kuru otunun IVGSYEM ve

IVGKMS değerleri önemli derecede yüksek, fiğ ve yonca kuru otlarının IVGSYEM ve IVGKMS değerleri ise birbirlerine benzer bulundu (Tablo 2). Çalışmada karamba kuru otu+fiğ kuru otu ve karamba kuru otu+yonca kuru otu karışımlarında karamba kuru otu miktarı arttıkça IVGSYEM, IVGKMS ve IVNDFS KM (Tablo 3) ve IVGOMSKM (Şekil 1) değerlerinde artış belirlendi.

Tablo 2. Karamba, fiğ ve yonca kuru otları ile karışımlarının besin madde bileşimleri (%)

Table 2. Nutrient composition of caramba, vetch and alfalfa hays and their mixtures (%)

	KM	HK	HP	ADF	NDF
Karamba otu	92.34	12.48	17.80	31.79	52.12
Fiğ otu	93.31	7.84	15.40	38.08	42.12
Yonca otu	93.19	10.12	16.60	42.60	49.74
%75Fiğ otu+%25Karamba otu	93.10	8.53	16.15	36.68	44.24
%50Fiğ otu+%50Karamba otu	92.72	8.80	16.73	35.33	47.30
%25Fiğ otu+%75Karamba otu	93.34	9.18	17.35	33.60	49.25
%75Yonca otu+%25Karamba otu	92.84	10.74	17.00	39.20	50.50
%50Yonca otu+%50Karamba otu	92.45	11.20	17.10	36.95	50.80
%25Yonca otu+%75Karamba otu	92.50	11.87	17.62	34.65	51.65

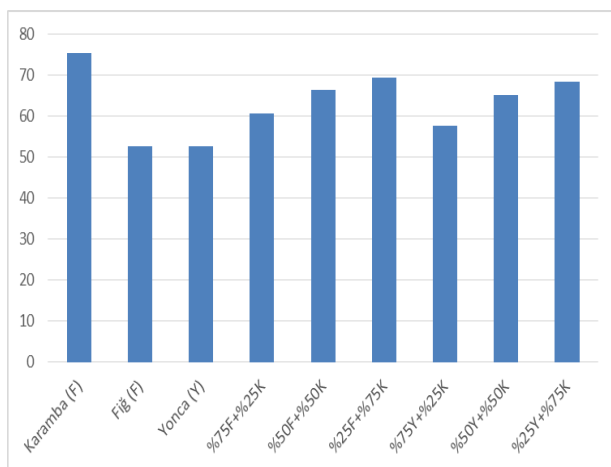
KM: Kuru madde, **HK:** Ham kül, **HP:** Ham protein, **ADF:** Asit deterjan lif, **NDF:** Nötral deterjan lif

Tablo 3. Karamba, fiğ ve yonca kuru otları ile karışımlarının *in vitro* sindirilebilirlik değerleri (%)

Table 3. *In vitro* digestibility values of caramba, vetch and alfalfa hays and their mixtures (%)

	IVGSYEM $x \pm Sx$	IVGKMS $x \pm Sx$	IVNDFS KM $x \pm Sx$
Karamba otu	76.31±1.09 ^b	74.35±1.18 ^b	27.18±0.94 ^{cdefg}
Fiğ otu	54.29±0.35 ^a	51.00±0.37 ^a	19.97±0.33 ^{ab}
Yonca otu	54.39±0.79 ^a	51.06±0.85 ^a	16.89±0.71 ^a
%75Fiğ otu+%25Karamba otu	62.09±0.82 ^{fc}	59.28±0.88 ^{fc}	27.96±0.70 ^{fg}
%50Fiğ otu+%50Karamba otu	67.43±0.56 ^{gd}	64.87±0.60 ^{gd}	27.34±0.41 ^g
%25Fiğ otu+%75Karamba otu	70.27±0.43 ^{heg}	68.15±0.45 ^{heg}	22.91±0.40 ^{hb}
%75Yonca otu+%25Karamba otu	58.78±0.88 ^c	55.61±0.95 ^c	18.27±0.82 ^a
%50Yonca otu+%50Karamba otu	66.05±0.78 ^d	63.28±0.85 ^d	24.15±0.71 ^{deh}
%25Yonca otu+%75Karamba otu	69.37±0.94 ^{ed}	66.87±1.01 ^{ed}	24.11±0.79 ^{eh}

Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0.05). **IVGSYEM:** *In vitro* gerçek sindirilebilirlik (yem), **IVGKMS:** *In vitro* gerçek kuru madde sindirilebilirliği, **IVNDFS KM:** *In vitro* NDF sindirilebilirliği (kuru maddede)



Şekil 1. Karamba, fiğ ve yonca kuru otları ile karışımlarının IVGOMSKM değerleri (%)

Figure 1. IVOMD_{DM} values of caramba, vetch and alfalfa hays and their mixtures (%)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmada kullanılan karamba, fiğ ve yonca yem bitkilerinin HP içerikleri %15.40 (fiğ) ile %17.80 (karamba) arasında değişmiştir. Rumende mikrobiyel aktivitenin normal devam edebilmesi için, rasyonun HP değerinin %7'nin üzerinde olması gerektiği bildirilmektedir. Bu düzeyin altındaki HP miktarının mikroorganizmaların gelişimi, fermentasyonu, mikrobiyel protein sentezini dolayısıyla ince bağırsağa geçen mikrobiyel protein miktarını olumsuz etkilediği bildirilmektedir. Bu durum ruminantlarda asıl protein kaynağının mikrobiyel protein sentezi olduğu düşünüldüğünde rasyondaki HP değerinin önemi ortaya çıkmaktadır (Cappellozza 2013). Çalışmada yem materyali olarak kullanılan karamba, fiğ ve yonca kuru otlarının hücre duvarı unsurlarından NDF değeri sırasıyla %52.12, 42.12 ve 49.74, ADF değeri sırasıyla %31.79, 38.08 ve 42.60 olarak saptanmıştır. Hücre duvarı bileşenlerine ilişkin sonuçlar değerlendirildiğinde karambanın NDF ve ADF değerlerinin, Özelçam ve ark. (2015) tarafından yapılan araştırmadaki değerlerden daha düşük, Goktepe ve

Selcuk (2017)'un karambanın üçüncü ve dördüncü biçimi için bildirdiği değerler ile benzer olduğu görülmektedir. Çalışmada fiğ ve yonca kuru otuna ait NDF ve ADF değerleri Karabulut ve ark. (2007)'in bulgularından daha yüksek belirlenmiştir. Fiğ kuru otuna ait NDF değeri Gürsoy ve Macit (2015) tarafından yapılan araştırmada kullanılan fiğ çeşitlerine ait NDF değerlerinden daha düşük bulunurken, ADF değeri ise daha yüksek saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada yonca kuru otuna ait gerek NDF gerekse ADF değerleri ise Gürsoy ve Macit (2015)'in çalışmasının yem materyalini oluşturan yonca çeşitlerine ait değerlerden daha yüksek bulunmuştur.

Ruminant beslemede kaba yemlerin enerji ve besleme değerleri, yemin besin madde kompozisyonu, kuru madde ve organik madde sindirilebilirlikleri ile yakından ilişkilidir. Rasyonun bileşimindeki kaba yemlerin miktarı, türü ve işleme teknikleri gibi faktörler de kaba yemin sindirilebilirliği üzerine etkilidir.

Mevcut yem değerlendirme sistemleri genellikle kaba yemlerin sindirilebilirlik, enerji ve azot değerlerinin yanı sıra kaba yemin istekli olarak bireysel tüketim miktarına dayanırken, rasyondaki farklı kaba yem bileşenleri arasında gerçekleşebilecek olası etkileşimleri dikkate almamaktadır. Bununla birlikte, bu etkileşimler ruminantlarda başta rumen olmak üzere sindirim sistemi içerisinde gerçekleşen bir takım metabolik süreçleri değiştirebilmektedir (Niderkorn ve Baumont 2009). Diğer bir ifadeyle tüketilen kaba yem karışımlarının, karışımda bulunan yem maddelerinin bireysel tüketimlerine göre besleme değerleri ve sindirilebilirlikleri daha yüksek (yemler arası pozitif etki) ya da daha düşük (yemler arası negatif etki) olabilmektedir (Niderkorn ve Baumont 2009). Araştırma sonuçları incelendiğinde, karışımlarda artan düzeylerde karamba kuru otu içeren kombinasyonların $IVGS_{YEM}$, $IVGKMS$ ve $IVGOMS_{KM}$ değerleri fiğ kuru otuna ve yonca kuru otuna ait söz konusu sindirilebilirlik değerlerinden daha yüksek bulunmuştur. Özelçam ve ark. (2015) tarafından yapılan bir çalışmada karamba kuru otunun *in vivo* kuru madde sindirilebilirliği %79.58 olarak bulunmuştur. Goktepe ve Selcuk (2017) tarafından yapılan bir diğer araştırmada ise karamba otunun $IVGKMS$ değerleri birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci biçimlerde sırasıyla %87.02, 85.05, 82.14, 77.14 ve 70.86 olarak saptanmıştır. Yapılan bu çalışmada karamba kuru otunun % $IVGKMS$ değeri Özelçam ve ark. (2015), Goktepe ve Selcuk (2017) tarafından bildirilen değerlere benzerdir.

NDF sindirilebilirliği NDF için sindirim katsayısının bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Kaba yemin NDF sindirilebilirliği, rasyonun enerji değeri üzerine önemli bir etki gösterebilir. Bu nedenle kaba yemlerin ve rasyonların NDF sindirilebilirliklerinin de göz önüne alınması gerekir. Nitekim artan NDF sindirilebilirliği kaba yemin ya da rasyonun enerji değerini artırmaktadır. Bununla birlikte NDF sindirilebilirliği kaba yemin türüne, genetik yapısına, iklime, bitkinin olgunluk durumuna ve çevresel koşullara bağlı olarak önemli düzeyde değişiklik gösterebilmektedir. Baklagil otları çimlere göre daha yüksek bir lignifikasyon derecesine sahip olduğundan baklagillerin NDF sindirilebilirliği genellikle daha düşük olmaktadır (Oba ve Allen 1999). Çalışmamızda karamba kuru otu+fiğ kuru otu karışımlarında %25 ve üzerinde, karamba kuru otu+yonca kuru otu karışımlarında %50 ve üzerinde karamba kuru otuna yer verilmesinin fiğ ve yonca kuru otlarına ait $IVNDFS_{KM}$ değerlerini önemli düzeyde arttırdığı saptanmıştır. Bitkinin başta genetik yapısı ve yetiştiği iklim koşulları NDF sindirilebilirliği üzerinde etkili olması yanında, bu araştırmada olduğu gibi

farklı kaba yemlerin farklı düzeyde karışımları da NDF sindirilebilirliğini etkileyebileceği ifade edilebilir.

Linn ve Martin (1999) bitki türlerinin yem kalitesi bakımından büyük farklılıklar gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, hücre duvarı bileşenleri (selüloz, hemiselüloz ve lignin) ile yem bitkisinin sindirilebilirliği arasında yakın bir ilişkinin olduğunu, buğdaygillerin baklagillere göre daha fazla NDF içerdikleri halde, daha düşük lignin oranına sahip olduklarından buğdaygillerin daha çok sindirilebilir selüloz içerdiklerini bildirmişlerdir. Rebole ve ark. (2004) yem bitkilerinde enerji sağlayan yapısal karbonhidratların NDF sindirilebilirliği ile ilişkili olduğunu ifade etmiştir. Yapılan bu çalışmada da buğdaygil familyasının bir üyesi olan karamba kuru otunun % $IVNDFS_{KM}$ değeri baklagil familyasından olan fiğ ve yonca kuru otuna göre önemli düzeyde yüksek, fiğ ve yonca kuru otlarının % $IVNDFS_{KM}$ değerleri ise birbirlerine benzer bulunmuştur. Bununla beraber, karamba kuru otu+yonca kuru otu karışımlarına ilişkin sonuçlar incelendiğinde, karışımlarda %50 ve üzerinde karamba kuru otu içeren kombinasyona ait % $IVNDFS_{KM}$ değeri karışımda %25 karamba kuru otu içeren kombinasyona ve yonca kuru otuna ait % $IVNDFS_{KM}$ değerinden önemli düzeyde yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak, karamba kuru otunun, fiğ ya da yonca kuru otuyla oluşturacağı kaba yem karışımlarında artan düzeylerde bulunması *in vitro* gerçek sindirilebilirlik parametrelerini olumlu yönde etkilemiştir. Fiğ kuru otu ve yonca kuru otunun karambaya oluşturulan karışımlarının sindirilebilirlik değerlerinin, fiğ kuru otunun ve yonca kuru otunun bireysel sindirilebilirlik değerlerinden daha yüksek olmasının nedeni yemler arası pozitif bir etkileşimden kaynaklı olabileceğidir. Bu konuda yapılacak olan çalışmalarda karamba kuru otunun fiğ ve yonca kuru otuyla oluşturulan kombinasyonlarının performans ve rumen fermentasyonu üzerine etkilerinin hayvan denemeleri ile desteklenmesi önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, ilk yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.VET.1904.16.006 proje numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca Makalenin sadece *in vitro* kuru madde sindirilebilirlik değerine ilişkin bulgu " 5th International Vet-Istanbul Group Congress" de sunulmuştur ve kongre kitapçığında özet olarak basılmıştır.

KAYNAKLAR

- AOAC (2006)**. Official Methods of Analysis, 18th Edition, Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburgs, MD.
- Bernard JK, West JW, Trammell DS (2002)**. Effect of replacing corn silage with annual ryegrass silage on nutrient digestibility, intake, and milk yield for lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 85, 2277-2282.
- Cappellozza BI (2013)**. Protein nutrition for cattle. Oregon state university, *Beef103*, 1-4.
- Cooke KM, Bernard JK, West JW (2008)**. Performance of dairy cows fed annual ryegrass silage and corn silage with steam-flaked or ground corn. *J Dairy Sci*, 91, 2417-2422.
- Goktepe AE, Selcuk Z (2017)**. Relative feed value and digestibility of karamba (*Lolium multiflorum* cv. Caramba) for ruminants. *Anim Nutr Feed Techn*, 17, 423-431.
- Gürsoy E, Macit M (2015)**. Erzurum ili meralarında doğal olarak yetişen bazı baklagil yem bitkilerinin *in vitro* gaz üretim değerlerinin belirlenmesi. *Anadolu J Agr Sci*, 30, 292-299.
- Karabulut A, Canbolat Ö, Kalkan H, Gurbuzol F, Sucu E, Filya İ (2007)**. Comparison of *in vitro* gas production, metabolizable energy, organic matter digestibility and microbial protein production of some legume hays. *Asian-Aust J Anim Sci*, 20 (4), 517-522.

- Kellems RO, Church DC (2002).** Nutrients: Their metabolism and feeding standarts. In: Livestock feeds and feeding, Kellems RO, Church DC (Eds), 5th Ed., 16-39, Prentice Hall.
- Kesiktaş M (2010).** Karaman'da farklı ekim zamanları ve azotlu gübre dozu uygulamalarının İtalyan Çiminin (*Lolium multiflorum westerwoldicum* Caramba) yem verimine etkisi. Çukurova Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Adana, Yüksek Lisans Tezi, 1-59.
- Kusvuran A (2011).** The effects of different nitrogen doses on herbage and seed yields of annual ryegrass (*Lolium multiflorum cv. Caramba*). *Afr J Biotechnol*, 10 (60), 12916-12924.
- Kusvuran A, Tansı V (2011).** The effects of different row spacing on herbage and seed yields of annual ryegrass (*Lolium multiflorum cv. Caramba*). *Bulg J Agric Sci*, 17 (6), 744-754.
- Linn JG, Martin NP (1999).** Forage quality tests and interpretations. *Fact Sheet AGFO-2637*. Minnesota Extension Service, University of Minnesota, St. Paul.
- Niderkorn V, Baumont R (2009).** Associative effects between forages on feed intake and digestion in ruminants. *Animal*, 3, 951-960.
- Oba M, Allen MS (1999).** Evaluation of the importance of the digestibility of neutral detergent fiber from forage: effects on dry matter intake and milk yield of dairy cows. *J Dairy Sci*, 82: 589-596.
- Özelçam H, Kırkpınar F, Tan K (2015).** Chemical composition, in vivo digestibility and metabolizable energy values of Caramba (*Lolium multiflorum cv. Caramba*) fresh, silage and hay. *Asian Australas J Anim Sci*, 28 (10), 1427-1432.
- Rebole A, Alzueta C, Ortiz LT, Baro C (2004).** Yield and chemical composition of different parts of the common vetch at flowering and two seed filling stages. *Span J Agric Res*, 2 (4), 550-557.
- Shao T, Zhang ZX, Shimojo M, Wang T, Masuda Y (2005).** Comparison of fermentation characteristics of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.) and Guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.) during the early stage of ensiling. *Asian Australas J Anim Sci*, 18, 1727-1734.
- SPSS (2012).** IBM SPSS statistics for Windows, version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.





Investigating the Agriculture-Animal Husbandry Potentials of Trainees Who Receive Training at DAP Farmer Training Center at Van Yüzüncü Yıl University

Serhat YILDIZ¹ Suna AKKOL² Suphi DENİZ³

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Vocational School of Gevas, Department of Veterinary, Van, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Agriculture, Department of Biometry and Genetics, Van, Turkey

³ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Van, Turkey

Received: 11.02.2019

Accepted: 01.10.2019

ABSTRACT

This study was carried out with the purpose of determining the general statuses and current production infrastructures of farmers in the province of Van in Turkey who deal with agriculture and animal husbandry and providing recommendations by finding out about the problems that lead to reduction in production. For this purpose, survey forms that were held with trainees who attended training programs at DAP (Eastern Anatolian Project) Farmer Training Center at Van Yüzüncü Yıl University were utilized. The vast majority (89.51%) of the participants of these training programs consisted of low-income individuals, and a significant part among these individuals (37.90%) owned agricultural land with areas in the range of 5-20 da. The ratios of those who acquired the coarse feeds and concentrate feeds that were used at their establishment from outside were found respectively as 21.55% and 43.56%. Most participants stated that they grazed their animals in forage land (90.87%) and did not use silage (81.60%). 60.37% of the participants took part in cattle breeding, 28.11% took part in sheep breeding, 53.54% were not involved in any agricultural association, and 58.18% did not receive agriculture-related assistance. The main problem in the establishments was determined as feeds and feeding the animals (25.75%), which were followed by health problems (21.89%).

Keywords: Enterprise Structure, Feed and Nutrition Problems, Mechanization, Health

ÖZ

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde Eğitim Alan Kursiyerlerin Tarım-Hayvancılık Potansiyellerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışma, Van ilinde tarım ve hayvancılıkla uğraşan çiftçilerin genel durumlarını ve mevcut üretim altyapılarını belirlemek, üretimin azalmasına neden olan sorunların saptanarak çözüm önerilerinde bulunmak amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi DAP (Doğu Anadolu Projesi) Çiftçi Eğitim Merkezi'nde eğitimlere katılan kursiyerlerle yapılan anketler kullanılmıştır. Eğitimlere katılanların büyük çoğunluğu düşük gelirli (%89.51) bireylerden oluşmakta ve önemli bir bölümünün 5-20 da (%37.90) tarım arazisine sahip oldukları belirlenmiştir. İşletmede kullanılan kaba ve kesif yemleri, dışarıdan temin edenlerin oranı sırasıyla %21.55 ve %43.56 olarak bulunmuştur. Ankete katılanların çoğunluğunun hayvanlarını merada (%90.87) otlattıkları ve silaj kullanmadıkları (%81.60) belirlenmiştir. Ankete katılanların %60.37'sinin sığırcılıkla, %28.11'inin koyunculukla uğraştıkları, herhangi bir tarımsal örgütlenmede yer almayanların oranı %53.54 ve tarımsal desteklerden faydalanmayanların oranı ise %58.18 olarak tespit edilmiştir. İşletmelerde yem ve hayvan besleme sorunu (%25.75) temel sorun olarak belirlenmiş, bunu sağlık sorunları (%21.89) izlemiştir.

Anahtar Kelimeler: İşletme Yapısı, Yem ve Beslenme Sorunları, Mekanizasyon, Sağlık

GİRİŞ

Ülkemizin Doğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan Van ili, şiddetli karasal bir iklime sahip olmakta birlikte, ülkenin en fazla güneş alan illerinden biridir. Van İli 2.100.300 ha alana sahip olup, arazilerinin %17.72'sini tarım, %64.71'ini çayır-mera, %1.25'ini orman fundalık ve %16.32'sini de tarım dışı arazi oluşturmaktadır. Toplam

tarım arazisinin %27.2'si hububat ekim alanı, %28.1'i yem bitkileri ekim alanı, %0.5'i diğer tarla ürünleri ekimi, %1.2'si bağ-meyve tarımı, %0.4'ü açıkta sebze üretim alanı, %30.8'i nadas alanı ve %1.8'ini kullanılmayan tarım arazileri oluşturmaktadır. Van İli'nde 372.196 hektar tarım arazisinin 123.173 hektarı (%33.1) sulanmaktadır. Kaba yemler içerisinde çayır-meralar toplam üretimin

%43.4'ünü oluşturmakta, yem bitkilerinin payı ise %44.4'tür. Toplamda 119.733 ha çayır alanları, 1.239.289 ha mera alanlarına sahiptir (Anonim 2013; TÜİK 2018a). Van ili, Türkiye'de hayvancılık faaliyetlerinin en yoğun olarak yapıldığı iller arasında yer almaktadır. 2017 verilerine göre Van ilinde her yaşta toplam 186.099 büyük baş ve 2.738.054 küçükbaş hayvan bulunurken Ülke genelinde ise toplam 16.103.025 büyük baş ve 44.312.308 küçükbaş hayvan bulunmaktadır (TÜİK 2018b).

Hayvancılık faaliyetlerinden elde edilen ürünlerin başında süt ve süt ürünleri ile et ve et ürünleri gelmektedir. Küçükbaş hayvancılık kapsamında koyun sütü üretiminde 119.209 ton ile lider kent konumundadır. Bunun yanında Van ili keçi sütü üretiminde de 9.843 ton ile 8. sıra ile ülkenin önemli kentleri arasındadır. Kırmızı et üretiminde ise Van ili büyükbaş hayvancılıkta orta sıralarda, küçükbaş hayvancılıkta ise üst sıralardadır. Büyükbaş ve küçükbaş hayvancılık faaliyetlerinin en temel girdisi yemdir. Ayrıca yem, büyükbaş ve küçükbaş hayvancılık faaliyetlerindeki maliyetlerin büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Mevcut durumda yem bitkileri, Van ilinde en fazla alanda yetiştiriciliği yapılan tarımsal üründür. Ayrıca, yem bitkileri tarımının yüksek olması, tarıma dayalı sanayiinin gelişmesine de yardımcı olmaktadır (TÜİK 2018a).

Ülkelerin kalkınması için lokomotif güce sahip sektörlerin başında eğitim faaliyetleri gelmektedir. Tarımsal faaliyetleri gelişmiş ülkelere bakıldığında, bunların tarımsal eğitime de önem verdikleri görülmektedir. Ülkemizde ve özellikle Doğu Anadolu Bölgesi'nde, tarım sektöründe çalışanların büyük çoğunluğu eğitim seviyesi düşük bireylerden oluşmaktadır. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde tarımsal faaliyetler kapsamında verilen eğitimlere katılan kursiyerlerle yapılan bir çalışmada, kursiyerlerin eğitim düzeylerinin çok düşük olduğu (ilköğretim ve altı %78.91), bu kursiyerlerin sadece %21.72'sinin daha önce herhangi bir tarımsal eğitim aldığı tespit edilmiştir (Yıldız ve ark. 2019).

Ülkemizde kırsal alanda yaşayan insanların birçoğu geçimini tarımsal faaliyetlerden sağlamaktadır. Kullanılabilir arazi kaynakları sınırlı olduğundan, kırsal kesimin hayat standardını yükseltmek ve daha iyi bir yaşam düzeyini sağlamak, tarımda sınırlı üretim kaynaklarından en iyi şekilde yararlanmakla mümkün olacaktır. Bu nedenle, Van ilinde mevcut tarımsal faaliyetlerle uğraşan çiftçilerin genel durumlarını ve mevcut üretim altyapılarını belirlemek, üretimin azalmasına yol açan sorunların saptanarak çözüm önerilerinde bulunmak amacıyla, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde eğitimlere katılan kursiyerlerle bu çalışma yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde eğitimlere katılan 250 kursiyer ile yüz yüze gerçekleştirilen görüşmelerle yapılan anketlerden elde edilen veriler, çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Eğitimlere Van ilinin Bahçeşarayı, Çatak, Edremit, İpekyolu, Muradiye, Tuşba ve Özalp ilçelerinden katılımlar gerçekleşmiştir. Anket çalışması Mayıs 2017-Mayıs 2018 tarihleri arasında yapılmıştır. Anket sorularının değerlendirilmesinde SAS (2014) paket programı kullanılmış ve verilere ki-kare (χ^2) test istatistiği uygulanmıştır.

BULGULAR

Eğitilmelere katılan kursiyerlerin bazı özellikleri

Eğitilmelere katılan çiftçilerin (kursiyer) büyük çoğunluğunun 31-40 yaşları arasında (%30.00) olduğu; kadın kursiyerlerin oranı %5.65, erkek kursiyerlerin oranı %94.35; evli olanların oranı %80.17, bekâr olanların oranı ise %19.92 olarak belirlenmiştir. Ankete katılanların %56.68'inin 5-6 ve daha fazla sayıda çocuğa sahip olduğu ve hane halkı sayısına göre çoğunlukla 6-7 kişi ve daha kalabalık ailelerden (%74.50) meydana geldiği tespit edilmiştir. Eğitim düzeyleri incelendiğinde, okula gitmeyenlerin oranı %13.36, okur-yazar olanların oranı %19.43, ilköğretim mezunu olanların oranı %22.27, ortaokul mezunu olanların oranı %19.03, lise ve dengi okul mezunu olanların oranı %10.93, üniversite mezunu olanların oranı ise %4.45 olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Gelir-gider durumu

Eğitilmelere katılan kursiyerlerin büyük çoğunluğu, kendi evlerinde (%80.42) ikamet ettiklerini ve 2000 TL'nin altında aylık gelire (%89.51) sahip olduklarını ifade etmişlerdir. Kursiyerlerin %70.89'unun tarım dışı gelirlerinin olmadığı, hayvancılık ile birlikte yapılan diğer tarımsal faaliyetlerin ise %11.86'ı meyvecilik, %11.86'ı sebzeçilik, %60.45'i tarla tarımı, %11.30'u ticaret ve %4.52'si diğer faaliyetler olduğu belirlenmiştir. Gider kalemlerinden olan veteriner hekim hizmeti alanların oranı %48.84 ve almayanların oranı ise %51.16 olarak belirlenmiştir (Tablo 2).

Hayvanların besleme durumu

Eğitilmelere katılan kursiyerlerin, hayvanları beslemek için kaba ve kesif yemleri, dışarıdan temin edenlerin oranı sırasıyla %21.55 ve %43.56 olmuştur. Kursiyerlerin çoğunluğunun hayvanlarını merada otlatmaları (%90.87) ve silaj kullanmayanların çoğunlukta (%81.60) olduğu belirlenmiştir. Yetiştiricilerin, hayvanların ihtiyaç duydukları tuz ve vitamin-mineral takviyelerini her gün (%17.12), haftada bir kez (%30.63), ayda bir kez (%22.97), yılda 1-2 kez (%16.22) ya da hiç vermedikleri (%13.06) belirlenmiştir (Tablo 3).

İşletme büyüklüğü ve hayvancılıkta makine kullanımı

Kursiyerlerin %37.90'ının 5-20 da, %25.57'sinin 20-50 da, %19.63'nün 50-100 da tarım arazisini işledikleri tespit edilmiştir. Hayvancılık faaliyetlerini kolaylaştıran tarımsal alet ve makine kullanımında ilk sırayı traktör kullanımı (%68.15) ve daha sonra ise sırasıyla; süt sağım makinası (%14.07), yem karıştırma makinası (%8.89), yem kırma makinası (%4.44), diğer makineler (%2.96) ve elektrikli kırma makinasının (%1.48) oluşturduğu belirlenmiştir (Tablo 4).

Hayvansal ürün elde edilmesi ve pazarlama

Kursiyerlerin uğraştıkları hayvancılık faaliyetlerine bakıldığında, %60.37'sinin sığırcılıkla, %28.11'inin koyunculukla uğraştıkları; ortalama hayvan sayısının sığırlarda 9.25, koyunlarda 71.12, olduğu belirlenmiştir (Tablo 5).

Tarımsal örgütlenme ve destekler

Kursiyerlerin büyük çoğunluğunun herhangi bir tarımsal örgütlenmede yer almadıkları (%53.54), ancak bir bölümünün (%18.58) tarımsal örgütlere üye olmaya istekli oldukları gözlenmiştir. Kursiyerlerin %41.82'sinin tarımsal desteklerden faydalandığı, %58.18'inin faydalanmadığı belirlenmiştir.

Hayvancılık faaliyetlerindeki sorunlar

Kursiyerlerin hayvancılık faaliyetlerinde karşılaştıkları sorunların başında yem ve hayvan besleme sorunu (%25.75) yer alırken, bunu sırasıyla, sağlık (%21.89), kredi ve destekleme (%8.15), damızlık (%6.01), bilgi ve eğitim (%3.86), altyapı (%3.43), pazarlama-satış (%3.00) sorunu izlemektedir. Kursiyerlerin çoğunun (%72.37)

bırakmayı düşünmediği tespit edilmiştir (Tablo 7). Çalışmada öğrenim durumu ve koyun-keçi varlığı ile diğer değişkenler arasında Ki-kare testi kullanılarak bağımsızlık testi yapılmış ve sonuçlar Tablo 8'de verilmiştir. Tablo 8 incelendiğinde değişkenler arasında herhangi anlamlı bir ilişki olmadığı görülmektedir.

Tablo 1. Eğitimlere katılan çiftçilerin bazı özellikleri**Table 1.** Some characteristics of farmers participating in trainings

Çocuk Sayısı	%	Yaş	%
1-2 çocuk	13.36	20 ve altı	5.60
3-4 çocuk	19.43	21-30	22.00
5-6 çocuk	22.27	31-40	30.00
7-8 çocuk	19.03	41-50	22.00
9-10 çocuk	10.93	51-60	15.20
11 ve üzeri çocuk	4.45	61 ve üzeri	5.20
Çocuk yok	10.53		
Öğrenim Durumu		Hane halkı Sayısı	
Okula gitmemiş	13.36	Tek	0.40
Okur-yazar	19.43	2-3 kişi	8.50
İlkokul mezunu	22.27	4-5 kişi	16.60
Ortaokul mezunu	19.03	6-7 kişi	25.10
Lise mezunu	10.93	8-9 kişi	23.89
Üniversite	4.45	10-11 kişi	16.60
Diğer	10.53	12 ve üzeri	8.91
Medeni Durum		Cinsiyet	
Evli	80.17	Kadın	5.65
Bekâr	19.92	Erkek	94.35

Tablo 2. Gelir-gider durumu**Table 2.** Income-expenditure situation

Evin Mülkiyeti	%	Aylık Gelir (TL)	%
Kendi evi	80.42	Asgari ücretten az	44.10
Kira	13.75	Asgari ücret	23.58
Lojman	5.00	1.501-2.000 arası	21.83
Başka	0.83	2.001-2.500 arası	3.93
Diğer Faaliyetler		2.501-3.000 arası	2.62
Meyvecilik	11.86	3.001-3.500 arası	2.18
Sebzecilik	11.86	3.501-4.000 arası	1.31
Tarla tarımı	60.45	4.001-4500 arası	0.44
Ticaret	11.30	4.501-5.000 arası	0.00
Diğer	4.52	5.001 ve üzeri	0.00
Veteriner Hekim Hizmeti		Ek Gelir	
Evet	48.84	Yok	70.89
Hayır	51.16	Kira	7.98
		Ek iş	19.72
		Diğer	1.41

Tablo 3. Hayvanların besleme durumu**Table 3.** Feeding status of animals

Kaba Yemlerin Temini	%	Kesif Yemlerin Temini	%
Mera- biçenekleri	24.14	Kendi üretimi	23.11
Kendim üretimi	22.41	Dışarıdan temin	43.56
Dışarıdan temin	21.55	Kendi üretimi ve dışarıdan temin	25.33
Kendi üretimi ve dışarıdan temin	18.97	Diğer	1.78
Diğer	0.43	İki veya daha fazla parametre seçenler*	6.22
İki veya daha fazla parametre seçenler*	12.50		
Tuz ve Vitamin-Mineral Takviyesi		Silaj Bitkilerinin Üretim ve Kullanım Durumu	
Yok	13.06	Evet	18.40
Yılda 1-2 kere	16.22	Hayır	81.60
Ayda bir kere	22.97	Hayvanlar Meraya Çıkıyor Mu?	
Haftada bir kere	30.63	Evet	90.87
Her gün düzenli	17.12	Hayır	9.13

Tablo 4. İşletmelerin büyüklüğü ve hayvancılıkta makine kullanımı**Table 4.** Businesses size and use of machinery in livestock

Kullanılan Tarım Arazisi Miktarı (Da)	%	Hayvancılıkta Kullanılan Ziraî Alet ve Makinalar	%	
5-20	37.90	Traktör	68.15	
20-50	25.57	Yem karıştırma makinası	8.89	
50- 100	19.63	Yem kırma makinası	4.44	
100-250	5.94	Süt sağım makinası	14.07	
250-500	4.57	Elektrikli kırkım makinası	1.48	
500-1000	3.20	Diğer	2.96	
1000 ve üzeri	3.20			
Tarım Arazilerinin Sulama Durumu		En Az	En Çok	Ortalama
Sulu		2	3500	73.02
Kıraç		1	900	66.62

Tablo 5. Hayvansal ürün elde edilmesi ve pazarlama**Table 5.** Animal product acquisition and marketing

Hayvan Türü	%	En Çok Üretilen Ürünler	%
Sığır	60.37	Süt	37.44
Koyun	28.11	Et-Besi	8.81
Keçi	3.23	Kanatlı eti	2.64
Kanatlı (Karışık)	4.15	Yumurta	3.96
Arıcılık	4.15	Bal	0.88
Hayvancılıkla İlgilenme Nedeni		Diğer	0.88
Geçim sağlamak	84.26	İki veya daha fazla parametre seçenler*	45.37
Ek gelir –yan gelir olsun diye	10.19		
Alışkanlık	3.24		
Hobi amaçlı	2.31		
Hayvan Sayıları	En Az	En Çok	Ortalama
Sığır	1	85	9.25
Koyun	1	1000	71.12
Keçi	1	100	19.17
Kanatlı (Karışık)	2	100	17.67
Arı Kovanı	1	400	57.47

*Bu sorularda iki veya daha fazla seçeneği seçenler bulunmaktadır.

Tablo 6. Tarımsal örgütlenme ve desteklerden faydalanma durumu**Table 6.** Agricultural organization and benefiting from support

Tarımsal Örgütlere Üyelik	%	Tarımsal Destek Durumu	%
Yok	53.54	Evet	41.82
Tarımsal kalkınma kooperatifi	7.52	Hayır	58.18
Sulama kooperatifi	1.77		
Tarım kredi kooperatifi	8.85		
Damızlık birliği	9.73		
Üye değil fakat istekli	18.58		

Tablo 7. Hayvancılık faaliyetlerindeki sorunlar**Table 7.** Problems in livestock activities

EN BÜYÜK SORUNLAR	%	FAALİYETLERİN BIRAKMA DURUMU	%
Sağlık	21.89	Hiç Düşünmüyor	49.56
Damızlık	6.01	Düşünmüyor	22.81
Alt yapı	3.43	Kararsız	16.67
Yem ve besleme	25.75	Düşünüyor	9.65
Pazarlama satış	3.00	İlk fırsatta hayvancılık faaliyetini bitirecek	1.32
Kredi ve destekleme	8.15		
Bilgi ve eğitim	3.86		
İki veya daha fazla parametre seçenler*	27.90		

*Bu soruda iki veya daha fazla seçeneği seçenler bulunmaktadır.

Tablo 8. Öğrenim durumu ve koyun keçi varlığı ile diğer bazı değişkenler arasındaki ilişki**Table 8.** Relationship between educational status and presence of sheep goat and some other variables

	Öğrenim Durumu		Sığır-koyun varlığı	
	X ²	P	X ²	P
Veterinerlik hizmeti alıp almadığı	7.0551	0.2166	1.2008	0.2732
Tuz ve vitamin-mineral takviyesi yapıp yapmadığı	7.1761	0.2079	0.8012	0.3707
Tuz ve vitamin-mineral takviyesi sıklığı	16.6897	0.6730	3.0897	0.5429
Tarımsal örgütlere üye olup olmadığı	5.7744	0.3288	0.5808	0.4460
Hayvan varlığı	16.8200	0.6646	-	-
Sığır-koyun varlığı	4.1239	0.5317	-	-

TARTIŞMA ve SONUÇ

Araştırmaya konu olan ve DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde verilen eğitimlere katılan kursiyerlerin %57.60'ının 40 yaş ve altında olduğu ve genç bir kitlenin eğitim almak istemesinin tarımsal faaliyetlerin geleceği açısından umut verici olduğu görülmektedir. Van ili Gevaş ilçesinde süt sığırcılığı üretim faaliyetinde bulunan 44 işletmenin sosyo-demografik ve işletmecilik özellikleri bakımından karşılaştırıldığı bir çalışmada, işletme sahiplerinin yaş ortalamasının 44.6 olduğu bildirilmiştir (Gençdal ve ark. 2016). Bu değer, yapılan bu çalışmada tespit edilen değerden düşüktür. Kadın kursiyerlerin oranının (%5.65) erkek kursiyerlerden (%94.35) çok daha az olduğu, eğitimlere katılanların büyük çoğunluğunun evli bireyler (%80.17) olduğu, yine hane halkı sayısına göre büyük çoğunluğunun 6-7 ve daha kalabalık ailelerden (%74.50) olduğu tespit edilmiştir. Van ilinde 2017 yılı ortalama hane halkı büyüklüğünün 5.2 kişi olduğu (TÜİK 2017a) dikkate alındığında, ankete katılan kursiyerlerin hane halkı büyüklüğünün Van ili ortalamasının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Dedeoğlu ve Yıldırım (2006)'ın Emek Tarımsal Kalkınma Kooperatifi'ne ortak işletmelerin ekonomik analizini yaptıkları bir çalışmada, incelenen işletmelerde ortalama hane halkı büyüklüğü 6 kişi olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuç, çalışmadan elde edilen bulgu ile uyumlu bulunmuştur. Karaturhan ve ark. (2014) tarafından yapılan bir çalışmada, ankete katılan kursiyerlerin %99'unun erkeklerden, %1'inin kadınlardan oluştuğu bildirilmiştir. Bu çalışmada, eğitimlere katılan kadınların bu oranın üstünde olması, olumlu bir gelişme olarak görülmektedir.

Yaşam kalitesini belirleyen kriterler arasında ikamet edilen ev ve evin mülkiyeti önemlidir (Yavuz ve ark 2014). Yapılan bu çalışmada, elde edilen verilere göre ankete katılanların büyük çoğunluğunun ikamet ettiği evin mülkiyetinin (%80.42) kendilerine ait olduğu belirlenmiştir. 2016 yılı gelir ve yaşam istatistiklerine göre Türkiye'de yaşayan fertlerin konut mülkiyetleri kendilerine ait olanların oranının %59.70 olduğu bildirilmektedir (TÜİK 2017b). Bu çalışmada elde edilen oranın 2016 yılı istatistik verilerinden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç, ankete katılan kursiyerlerin büyük bölümünün kırsal alanda ikamet etmesinden kaynaklanmaktadır. Yaşam kalitesini arttıran faktörlerden bir diğeri de gelir düzeyidir. Çiftçi eğitimlerine katılan kursiyerlerin aylık gelirleri incelendiğinde, çoğunluğun gelirinin asgari ücret ve altı (%67.68) olduğu görülmektedir (Tablo 2). 2016 yılı tarımsal işletme işgücü ücret yapısı istatistiklerine göre, Türkiye'deki sürekli tarım işçilerinin ortalama aylık ücretlerinin 1677 TL olduğu (TÜİK 2017c) ve bu değer, bu çalışmada elde edilen değerden daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ankete katılanların çoğunluğu gelirlerini arttırmak için çiftçilik

dışında ek geliri olmadığını (%70.89) ifade etmişlerdir. Bu durum, geçimlerini sağlamak için çiftçilikten başka alternatiflerinin olmadığını, bu sektöre bağımlı olduklarını göstermektedir. Hozman ve Akçay (2016) yaptıkları bir çalışmada, ankete katılanların %63'ünün tarım dışı geliri olmayan bireylerden oluştuğunu, %37'sinin ise tarım dışı gelire sahip olduklarını bildirmişlerdir.

Hayvancılıkla birlikte yapılan diğer faaliyetlerde tarla tarımı (%60.45) ilk sırada yer almakta, bunu meyvecilik (%11.86), sebzecilik (%11.86), ticaret (%11.30) ve diğer işler (%4.52) izlemektedir. Hozman ve Akçay (2016)'ın yaptıkları çalışmada, ankete katılan üreticilerin %17.2'si sadece bitkisel üretim, %32.3'ü hayvansal üretim ve %50.3'ünün ise, karma üretim yaptığı ortaya konmuştur. Yapılan bu çalışmada, ankete katılan ve hayvancılık faaliyeti yapan kursiyerlerin %48.84'ünün veterinerlik hizmeti aldıkları belirlenirken, Karakuş ve Akkol (2013) ise, hedef kitle çiftçilerin %52.64'ünün veteriner hekim hizmeti aldığını bildirmişlerdir.

DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde verilen eğitimlere katılan kursiyerlerin kullandıkları kaba ve kesif yemleri sırasıyla, %46.55 ve %23.11'inin kendisinin ürettiği, %21.55 ve %43.56'nin dışarıdan satın aldığı, %18.97 ve %25.33'nün ise, hem kendisinin ürettiği, hem de dışarıdan satın aldığı belirlenmiştir. Karakuş ve Akkol (2013)'un yaptıkları çalışmada ise, kaba ve kesif yemleri sırasıyla %12.26 ve %5.65'inin işletmenin kendisinden, %17.22 ve %15.86'sının dışarıdan satın aldığı, %70.52 ve %78.49'unun ise, hem kendisinin ürettiği, hem de dışarıdan satın aldığı bildirilmiştir.

İşletme giderlerinin azaltması ve sağlıklı bir hayvancılık için hayvanların meraya çıkarılması hayati öneme sahiptir. İncelenen hedef kitledeki yetiştiricilerin %90.87'sinin hayvanlarını meraya çıkarttıkları belirlenmiştir. Bu oran, Şahin ve Yılmaz (2008)'in yaptıkları çalışmada elde edilen değerden (%76.22) daha yüksektir. Kârlı bir hayvancılığın önemli bir faktörü olan silajın, ancak yetiştiricilerin %18.40'ı tarafından kullanıldığı belirlenirken, bu oran Şahin ve Keskin (2010)'in yaptığı çalışmada %25.20 olarak bildirilmiştir. Kursiyerlerin yetiştirdikleri hayvanların beslenmesinde tuz ve vitamin-mineral takviyesini yılda bir, ayda bir, haftada bir ve hiç kullanmayanların oranı sırasıyla %16.22, %22.97, %30.63 ve %13.06 olarak belirlenirken, tuz ve vitamin-mineral katkısı her gün düzenli olarak yapan yetiştiricilerin oranı %17.12'de kalmıştır. Karakuş ve Akkol (2013)'un çalışmalarında ise, tuz ve vitamin-mineral takviyesini yapanların oranı %57.95, yapmayanların oranı ise %42.05 olarak bildirilmiştir. Modern hayvancılıkta kullanılan, bitkisel üretim ve hayvancılık yapmayı kolaylaştıran, çiftçiler tarafından en çok tercih edilen zirai alet ve makinaların, işletme başına 0.68 adet traktör (%68.15) ve 0.14 adet süt sağım makinası (%14.07) olduğu belirlenmiştir. Güzel ve Aybek (2017) yaptığı çalışmada ele aldıkları

işletmelerdeki alet ve makinaların sayısının işletme ölçeği büyüdükçe sayısının arttığı, işletme başına ortalama traktör sayısının 0.76 ve tüm makine sayısının ise 8.59 adet, bunun 1.05'inin ise süt sağım makinesi olduğu bildirilmiştir. Eğitimlere katılan kursiyerlere yapılan ankette %60.37'sinin sığırcılıkla, %28.11'inin koyunculukla uğraştığı ve kişi başına ortalama 9.25 baş sığır ve 71.12 baş koyuna sahip oldukları tespit edilmiştir. Şahin ve Yılmaz (2008) çalışmalarında, işletmelerin %77.0'sinin büyükbaş hayvanlara, %69.7'sinin küçükbaş hayvanlara sahip olduklarını, bunun da işletme başına 4.61 BBHB (Büyükbaş Hayvan Birimi) büyükbaş, 36.08 baş küçükbaş hayvana karşılık geldiğini bildirilmektedirler. Bu değerlerin yapılan bu çalışmadan elde edilen değerlerden düşük olduğu görülmektedir. Tarımsal faaliyetlerle uğraşanlar için örgütlenme; mevcut sosyal yapı içinde birlikte karar alma ve sorumluluk bilincine sahip olarak insan kaynakları ve fiziki imkanları birleştirerek ortak tutum, davranış ve alışkanlıkların geliştirilmesine olanak sağlayan bir yapılanma olarak tanımlanmaktadır (Karatürhan ve ark 2014). Buna göre, yapılan bu çalışmada ankete katılan kursiyerlerin büyük çoğunluğunun herhangi bir tarımsal örgüte üye olmadıkları (%53.54), üye olmak isteyenlerin oranının ise, %18.58 olduğu belirlenmiştir. Karakaya ve Kızıloğlu (2014)'nın çalışmasında ankete katılan yetiştiricilerden herhangi bir tarımsal örgüte üye olmayanların oranı %42 olarak belirlenmiş ve bu değer, bu çalışmada elde edilen değerden daha düşük bulunmuştur. Ayrıca herhangi bir tarımsal destekten faydalanma durumu incelendiğinde, kursiyerlerin %41.82'sinin faydalandığı, %58.18'inin faydalanmadığı ifade edilmiştir. Demir ve ark (2015)'nin yaptığı çalışmada ise, ankete katılan üreticilerin %87.9'unun devlet teşviği ya da desteği aldığı, % 12.1'inin almadığı bildirilmiştir. Bu değerlerin bu çalışmadan elde edilen değerlerden yüksek olduğu görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, ankete katılanların hayvancılık faaliyetlerinde yaşadıkları sorunlarının sırasıyla; yem ve besleme (%25.75), hayvan sağlığı (%21.89), kredi ve destekleme (%8.15), damızlık (%6.01), bilgi ve eğitim (%3.86), altyapı (%3.43), pazarlama sorunları (%3.00) olduğu tespit edilmiştir. Karakaya ve Kızıloğlu (2014)'nın yapmış olduğu anket çalışması sonuçlarına göre ise, yetiştirici sorunlarının %36'sı ürünlerinin pazar imkanlarının artırılması, yine %36'sı veteriner hekim hizmeti konularında yetkililerden beklentilerinin olduğu, hayvancılık eğitimi konusunda beklentisi olan yetiştiricilerin oranının ise, %3 olduğu bildirilmiştir. Bu değerler, yapılan bu çalışma ile ortak parametrelerden elde edilen değerlerden (eğitim sorunu hariç) daha yüksek olduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; kırsal kesimde yaşayan insanlar ve çiftçiler, ülke kalkınmasını etkileyen önemli aktörlerdir. Kırsal kesimde yaşayan insanların çoğunluğu geçimini bitkisel üretim ve hayvancılıktan sağlamaktadır. Tarımsal faaliyetlerde üretim, gelir ve refah artışının sağlanabilmesi için üreticilerin etkin bir şekilde bilinçlendirilmiş olması oldukça önemlidir. Van'da tarımsal faaliyetlerle uğraşan üreticilerin bu sektörde bilinçlendirilmesi ve bu faaliyetleri verimli bir şekilde sürdürmeleri adına önemli bazı avantajlar bulunmaktadır. Bunlar;

➤ İlin geniş tarım ve mera arazileri sayesinde bol miktarda yem bitkileri üretiminin yapılması sonucu bitkisel üretim ve hayvancılık faaliyetleri için önemli bir potansiyelinin bulunması,

- Gelişmekte olan önemli dış pazarlara yakın ve genç işgücünün fazla ve ucuz olması,
- İlin geleneksel üretim çeşitliliğinin fazla olması,
- Tarımsal kirliliğin düşük olması nedeniyle organik tarım ve iyi tarıma elverişli olması,
- Yaz dönemi sebze ve meyve üretiminde geç, dönem hasat bakımından öneme sahip olması,
- İlde bitkisel ve hayvansal üretimin giderek artmasının, tarıma dayalı sanayinin gelişmesine katkı sağlama potansiyelinin bulunması,
- Çok sayıda küçükbaş ve büyükbaş hayvanın bulunması.

Bu çalışmada tespit edilen eksikliklerin ortadan kaldırılması ya da azaltılmasıyla, hedef kitlenin bitkisel ve hayvansal üretim potansiyellerinin artırılması mümkündür. Tespit edilen bazı eksiklikler özetlendiğinde;

- Verimsiz tarım arazilerinin hububat ve yem bitkileri üretiminde kullanılması,
- Düşük verimli hayvanların bulunması ve kaliteli damızlıkların temin edilememesi,
- Çiftçilerin arazilerinin küçük olması ve arazi toplulaştırılmasına ihtiyaç duyulması,
- Bölgede tarımsal teknolojinin yeterli düzeyde kullanılmaması,
- Üreticilerin bitkisel ve hayvansal üretim konusunda yeterli bilgi düzeyine sahip olmaması,
- Bölgede silaj vb. kaliteli kaba yemlerin yetersizliği ve kalitesiz kaba/kesif yemlerin hayvan beslemede kullanılması,
- Meraların verimsiz olması, mera otlatma kurallarına uyulmaması ve meralarda içme suyu sorunlarının olması,
- Yem maliyetleri ile ürün fiyatları arasında uçurum olması,
- Hayvan hastalıkları ile mücadelenin yetersiz olması,
- Hayvan barınaklarının uygun olmaması ve modernizasyon desteklerinin yetersiz olması,
- Ürünlerin uygun fiyatlarla pazarlanamaması,
- Tarımsal faaliyetlerde örgütlenmelerinin yeterince yaygın olmaması,
- Bitkisel ve hayvansal üretim desteklerinden yeterince faydalanılamaması,
- Uygun hayvan besleme yöntemlerinin kullanılmaması,
- Yasal ya da yasal olmayan şekilde yurtdışından getirilen ürünlerin yerli üretimi baskılaması gibi bahsi geçen eksiklikler, tarımsal faaliyetlerimizin geliştirilmesinin önünde engel olarak durmaktadır. Bu engellerin ortadan kaldırılmasında eğitimin büyük bir öneme sahip olduğu açıktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın özeti 21-23 Haziran 2019 tarihinde Ankara'da düzenlenen Hasat Uluslararası Tarım ve Orman Kongresi'nde sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Anonim (2013).** Van ili tarım ve hayvancılık raporu. http://www.vantso.org.tr/u/files/tarim_son.pdf Erişim tarihi: 01.12.2018
- Dedeoğlu M, Yıldırım İ (2006).** Emek Tarımsal Kalkınma Kooperatifine ortak işletmelerin ekonomik analizi. YYÜ Zir Fak, Tar Bil Derg, 16(1): 39-48
- Demir PA, Işık SA, Aydın E, Yazıcı K, Ayvazoğlu C (2015).** Socio-economic importance of sheep breeding farms in Ardahan province. Van Vet J, 26 (3) 141-146

- Gençdal F, Terin M, Yıldırım İ (2016).** Tarımsal Kalkınma Kooperatif ortağı olan ve olmayan süt sığırcılığı işletmelerinin belirli kriterler açısından karşılaştırılması: Van ili Gevaş ilçesi örneği. *GOPÜ Zir Fak Derg* 33 (1), 1-8 doi:10.13002/jafag905
- Güzel M ve Aybek A (2017).** Kahramanmaraş ili süt sığırcılığı işletmelerinin mekanizasyon yapısı. *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 20(2), 148-159, DOI : 10.18016/ksujns.88470
- Hozman SB ve Akçay H (2016).** Sivas ili Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği'ne üye süt sığırcılığı işletmelerinin bazı teknik ve ekonomik özellikleri. *Tar Eko Derg* 22-1
- Karakaya E ve Kızıloğlu S (2014).** Küçükbaş hayvancılık işletmelerinin örgütlenme yapısı Bingöl ili örneği. *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi* 1(4): 552-560
- Karakuş F, Akkol S (2013).** Van ili küçükbaş hayvancılık işletmelerinin mevcut durumu ve verimliliği etkileyen sorunların tespiti üzerine bir araştırma. *YYÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 18 (1-2):09-16
- Karaturhan B, Şevik T, Yıldız Ö (2014).** Yetiştirici birliklerinin tarımsal kalkınmaya etkileri üzerine bir araştırma: Edirne Damızlık Sığır Yetiştiricileri Birliği örnek olayı. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 51 (2) 175-184
- Şahin K ve Keskin B (2010).** Van ili Gevaş ilçesinde yem bitkileri üreten işletmelerin mevcut durumu ve sorunları. *Alınları*, 19 (B), 7-13 ISSN:1307-3311
- Şahin K ve Yılmaz İH (2008).** Van ilinde yem bitkileri tarımı, mera kullanımı ve sosyo ekonomik yapı üzerine bir araştırma. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi*, 14 (4) 414-419
- SAS (2014).** SAS/STAT. Statistical analysis system for Windows. Released version 9.4. SAS Institute Incorporation, Carry, NC, USA
- TÜİK (2017a).** Ortalama hane halkı büyüklüğü. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=27597> Erişim tarihi: 01.12.2018
- TÜİK (2017b).** Gelir ve yaşam koşulları araştırması, 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24579> Erişim tarihi: 01.12.2018
- TÜİK (2017c).** Tarımsal işletme işgücü ücret yapısı, 2016. <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=24565> Erişim tarihi: 01.12.2018
- TÜİK (2018a).** Van ili tarım sektörü yatırım kılavuzu. <http://www.daka.org.tr/panel/files/yayinlar/Van%20%C4%B0li%20Tar%C4%B1m%20Sekt%C3%B6r%C3%BC%20Yat%C4%B1r%C4%B1m%20K%C4%B1lavuzu.pdf> Erişim tarihi: 01.12.2018
- TÜİK (2018b).** İstatistik göstergeleri. <http://www.tuik.gov.tr/UstMenu.do?method=istgosterge> Erişim tarihi: 01.12.2018
- Yavuz F, Terin M, Güler İO, Akay B, Denizli G (2014).** Tarımsal üretimde kadının rolünün belirlenmesi üzerine bir çalışma: Bayburt ili örneği. *XI. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi 3-5 Eylül 2014, Samsun*
- Yıldız S, Akkol S, Deniz S (2019).** Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi DAP Çiftçi Eğitim Merkezi'nde Eğitim Alan Kursiyerlerin Tarımsal Okuryazarlık Kapasitelerinin Değerlendirilmesi. *YYÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, Cilt 24, Sayı 2, 133-141





Morphologic and Histologic Observation of Red-Legged Partridge's (*Alectoris Chukar*) Liver

Zekeriya ÖZÜDOĞRU¹ Hülya BALKAYA² Hülya KARA² Derviş ÖZDEMİR²

¹ Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Aksaray, Turkey

² Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Erzurum, Turkey

Received: 01.04.2019

Accepted: 04.10.2019

ABSTRACT

This study was aimed to investigate the liver of red-legged partridge in regards of morphologic and histologic features. In this study, the liver tissues of healthy ten red-legged partridges were removed and fixed into 10% formaldehyde solution for 72 hours. After fixation, the liver tissues were dehydrated through a graded alcohol series to xylene and embedded in paraffin blocks. Obtained sections 5-7 µm thickness of sections from paraffin blocks were stained with Crossman Modified Triple staining and examined for histologic structures. In morphologic examining, the liver of red-legged partridges consisted of two lobes. In addition, histologic analysis showed that liver tissue was covered with a thick connective tissue and this connective tissue made up of many smaller units of liver cells called lobules. Hepatocytes were seen radially round and located around central vena, which consists of remark cords. The squamous cells and Kupffer cells were observed in the sinusoidal lining. In conclusion; the results from this study indicated that there were some structural differences from other bird species, but not functionally.

Keywords: Liver, Morphology, Red-legged partridge

ÖZ

Kınlı Keklik (*Alectoris Chukar*) Karaciğerinin Morfolojik ve Histolojik Yöneden İncelenmesi

Bu çalışma ile kınlı keklik karaciğerinin morfolojik ve histolojik yöneden araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada sağlıklı on adet kınlı keklikten karaciğer dokuları çıkarıldı ve 72 saat boyunca %10 formaldehit çözeltisinde fiksasyonları sağlandı. Fiksasyon işleminden sonra, karaciğer dokuları dereceli alkol sıralarından geçirilerek dehidratasyonları sağlandıktan sonra parafin bloklara gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan 5-7 µm kalınlıkta kesitler alındı ve akabinde Crossman Modified Triple boyası yapıldıktan sonra histolojik yapılar incelendi. Morfolojik incelemede kınlı keklik karaciğerinin iki lobdan oluştuğu gözlemlendi. Histolojik analizde ise kınlı keklik karaciğer dokusunun kalın bir bağ doku ile çevrildiği ve bu bağ dokunun karaciğer hücrelerinden oluşan lobules adı verilen birçok küçük birimler şekillendirdiği belirlendi. Hepatositlerin yuvarlak oldukları ve central ven etrafında yerleşerek remark kordonlarını oluşturdukları görüldü. Sinozoid boşluklarda tek katlı yassı epitel hücreleri ve Kupffer hücreleri belirlendi. Sonuç olarak çalışma bulguları kuş türleri arasında bir takım yapısal farklılıkların bulunduğunu fakat fonksiyonel değişikliklerin olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Karaciğer, Kınlı keklik, Morfoloji

INTRODUCTION

Liver is the largest gland in the body and it can be regarded as the central organ in the maintenance of energy supply (Dellman and Brown 1979; Katz 1992; Dursun 1994; Bahadır and Yildiz 2005). It consists of two lobes as known right liver lobe and left liver lobe (Dursun 2002). The liver is digestive system organs and located in right hypochondriac region upper abdomen, which plays many vital functions. The liver is one of the most important organs gland and largest intestine gland. Many vital

functions are performed in the liver, like red blood cells production, glycogen storage, plasma and protein synthesis, hormone production and detoxification. Many enzymes are also made, intensified, stored, released and mixed into the blood in case of damage in the liver in hepatocytes (Mert 1997; Dolar 2002; Sarkarati and Douster 2012; Guyton and Hall 2013). Also, it has many functions in the body including metabolism of proteins, fats, carbohydrates and digestive functions, producing secretion of bile (Dibner and Richards 2004; Klein and Enders 2007; Hunigen et al. 2016). The vasculogenesis of

avian liver appears throughout differentiation of the portal vein, the hepatic artery, and the sinusoids (Deruiter et al. 1993).

The liver of avian is surrounded with a peritoneal layer of mesothelium and it has some differences from mammalian's liver such as absent connective tissue septa between lobules except in portal area (Schmidt et al. 2003). Also, avian hepatocytes are polyhedral cells with a large rounded, oval and centrally located nucleus, the sheets of hepatocytes are separated by sinusoids (Dyce et al. 2002; Faraj and Al-Bairuty 2016).

Normal gross anatomy and histology of red-legged partridge's liver is necessary for revealing of structural and functional differences between species. Therefore, the present research has been designed to understand morphologic and histologic features of red-legged partridges.

MATERIALS and METHODS

In this study, materials (liver tissues of ten red-legged partridges) from the thesis study which name is "Comparative Macroanatomical Study on the Lumbosacral Plexus of the Magpie (*Pica pica*) and Chukar partridge (*Alectoris chukar*)", which were obtained from Amasya Chukar Partridge Hutchery, were used.

Abdominal cavity of killed birds was opened and liver tissues were removed and fixed into 10% formaldehyde solution for 72 hours. After fixation period, all liver tissues were washed under tap water and dehydrated through a graded alcohol series to xylene and embedded in paraffin blocks. Obtained sections 5-7 μ m thickness of sections from paraffin blocks were stained with Crossman Modified Triple staining and examined for histologic structures and imagined with a light microscope (Nikon Eclipse i50, Japan).

RESULTS

In the anatomic examining, the liver of red-legged partridges consisted of two lobes as right and left liver lobes (Figure 1-C), replaced in right hypochondriac region. Proventriculus, gizzard, duodenum, gall bladder and spleen were in the neighborhood (Figure 1-A, B). The left liver lobe was divided by incisura interlobaris as lobus hepatis sinister lateralis and lobus hepatis sinister medialis. On the other hand, right liver lobe was bigger than the left liver lobe (Figure 1-C). It was observed that there were traces (impressio proventricularis, impressio ventricularis, impressio duodenalis, fossa vesical fellae, impressio lienalis) of proventriculus, gizzard, duodenum, gall bladder on visceral surface of liver (Figure 1-D). In addition, histologic analysis showed that liver tissue was covered a thick connective tissue and this connective tissue made up of many smaller units of liver cells called lobules (Figure 2-A). Hepatocytes were seen radially round and located around central vena, which consists of remark cords, which were usually arranged as two cell thickness between the liver sinusoids (Figure 2-B). The squamous cells and Kupffer cells were observed in the sinusoidal lining. The parenchyma tissue covered all central zones which narrowed towards the peripheries. The portal area consisted of the inter lobular connective septa which composed the branches of the portal vein, branch of hepatic artery and usually bile ducts (Figure 2-C, D). The inter-lobular capillaries penetrate the lobule and pass through the sinusoidal vessels, which are positioned between the liver's lobules (Figure 2-E). The bile duct was

lined by simple cuboidal epithelium, while the hepatic artery lined by endothelial cells of the simple squamous epithelium (Figure 2-F). Also, hepatocyte diameter is twenty-five microns in histomorphometric measurements.

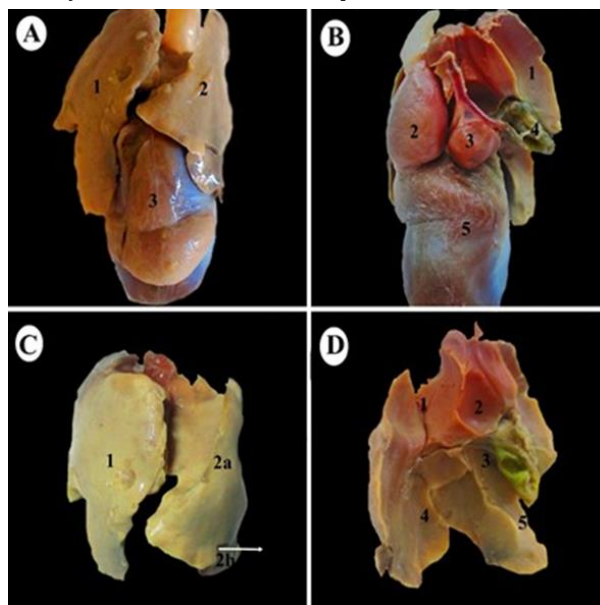


Figure 1. Macroscopic views of red-legged partridge's liver. A: Parietal surface of red-legged partridge's liver, (1); right liver lobe, (2); left liver lobe, (3); gizzard. B: Neighbor organs of red-legged partridge's liver, visceral surface, (1); right liver lobe, (2); proventriculus, (3); spleen, (4); gall bladder, (5); gizzard. C: Lobes of red-legged partridge's liver, parietal surface, (1); right liver lobe, (2a); lobus hepatis sinister lateralis, (2b); lobus hepatis sinister medialis, (Arrow) (ok); incisura interlobaris. D: Traces of organs on the red-legged partridge's liver, visceral surface, (1); impressio proventricularis, (2); impressio lienalis, (3); fossa vesicae fellae, (4); impressio ventricularis, (5); impressio duodenalis.

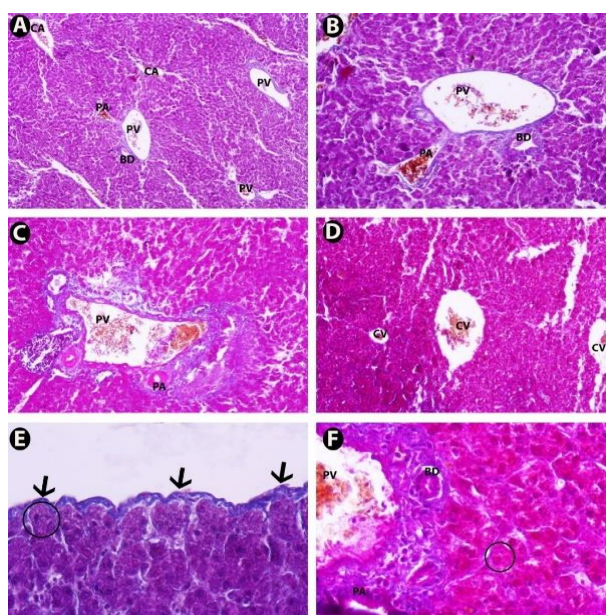


Figure 2. Histologic view of red-legged partridge's liver, Crossman Modified Triple staining. A: lower magnification view of liver, (BD); bile ducts, (CA); central artery, (PA); portal artery, (PV); Portal vena. B: Portal area of red-legged partridge's liver, (BD); bile ducts, (PA); portal artery, (PV); Portal vena. C: Interlobular septa of liver

tissue, branches of the portal vein, (PA); portal artery, (PV); Portal vena. D: Central vena of red-legged partridge's liver, (CV); Central vena. E: Capsule of red-legged partridge's liver, (Arrows); liver capsule, (Circle); hepatocyte as polyhedral in shape. F: Higher magnification of portal area in red-legged partridge's liver, (BD); bile ducts, (Circle); hepatocyte as polyhedral in shape, (PA); portal artery, (PV); Portal vena.

DISCUSSION and CONCLUSION

Although many studies carried out on this avian species, the liver is still a new topic in the histomorphological field, in order to better understand the histomorphology of the avian species. The present study had revealed that the histologic and morphologic structure of red legged partridge's liver were similar in many avian species reported previous studies (Akiyoshi and Inoue 2004; Dibner and Richards 2004; Iqbal et al. 2014). However, there were some differences among species such as species-specific metabolic activities, and adaptation changes. The anatomical analysis showed that the liver of the red legged partridge positioned in the right and left hepatoperitoneal cavity and consisted of two lobes. This result similar with previous reports (Dyce et al. 2002; Al-Aaraji 2015) which attributed that liver position, sizes and circumference of right and left lobe of liver in red legged partridges were due to differences in age, breeds, quality of feeds and environment conditions. Similar with previous poultry studies (Whitlow 2000; Iqbal et al. 2014; Tasci et al. 2018), our results were confirmed that the right liver lobe of the poultry liver was bigger than the left liver lobe, which were composed of incisura interlobaris as lobus hepatis sinister lateralis and lobus hepatis sinister medialis. Also, left liver lobe was a large lobed gland and covered by a thin capsule of continuous connective tissue, this tissue was subdivided the liver into lobes and provide physical support.

In our histologic analysis, the red legged partridge's liver covered by a thin connective tissue that made up smaller hepatic lobes and hepatocytes were seen round and centrally replaced nuclei. Although, this results showed the similar structure with chicken (Iqbal et al. 2014) and quail (Deruiter et al. 1993), turkey (Al-Aaraji 2015) and domestic fowl (Akiyoshi and Inoue 2004), the hepatosinusoidal arrangement has been largely attributed metabolic functions including synthesis of bile, plasma proteins, fibrinogen and prothrombin and the regulation of blood glucose and lipids. Although, similar to our results, Quentin (Quentin et al. 2005) has showed that the reticular fiber supported the liver cords and elastic fibers supported in capsule and vessels in the chickens, Das et al. (2018) reported that the hepatic lobules were unclear (except the hilum) due to a lack of periobular connective tissue. The general histological structure of the legged partridge's liver was mainly similar to those of other avian species. In conclusion, the comparative histomorphological study of avian species was less carried out by previous research. This type of researches provides various data about differences or similarities in the many fields. This analysis has demonstrated many similarities and some functional

variations in the avian of liver histologic architecture. The results indicated that there were some structural differences from other bird species, but not functionally, contributing to different studies about the histomorphology of liver in the avian species.

REFERENCES

- Akiyoshi H, Inoue A (2004).** Comparative histological study of teleost livers in relation to phylogeny. *Zool Sci*, 21, 841-850.
- Al-Aaraji AS (2015).** Study of some anatomical and histological characteristics in liver of male indigenous turkey (*Meleagris gallopavo*). *Bas J Vet Res*, 14, 150-157.
- Bahadır A, Yıldız H (2005).** *Veteriner Anatomi II, İç Organlar*. 1st ed., 51-53, Ezgi Kitabevi, Bursa.
- Das S, Dhote BS, Sinha S (2018).** Micrometrical studies on the gizzard of Kadaknath fowl. *Int J Avian Wildlife Biol*, 3, 259-260.
- Dellman HD, Brown ES (1979).** *Textbook of Veterinary Histology*. 985, Lea and Fibger, Philadelphia.
- Deruiter MC, Poelmann RE, Mentink MM, et al. (1993).** Early formation of the vascular system in quail embryos. *Anat Rec*, 235, 261-274.
- Dibner JJ, Richards JD (2004).** The digestive system: Challenges and opportunities. *Missouri J Appl Poult Res*, 13, 86-93.
- Dolar E (2002).** *Klinik Karaciğer Hastalıkları*. 1st ed., 133-146, Nobel&Güneş Tıp Kitabevi, Ankara.
- Dursun N (1994).** *Veteriner anatomi II*. 10th ed., 63-69, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Dursun N (2002).** *Evcil Kuşların Anatomisi*. 3rd ed., 68-70, Medisan Yayınevi, Ankara.
- Dyce K, Sack WO, Wensing GJG (2002).** The digestive system. In "Textbook of Veterinary Anatomy". 5th ed., 806-811, WB Saunders Co USA.
- Faraj SS, Al-Bairuty GA (2016).** Morphological and histological study of the liver in migratory starling bird (*Sturnus vulgaris*). *MSJ*, 27(5), 11-16.
- Guyton AC, Hall JE (2013).** *Tıbbi Fizyoloji*. 12th ed., 937-942, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Hunigen H, Mainzer K, Hirschberg RM et al. (2016).** Structure and age-dependent development of the turkey liver: a comparative study of a highly selected meat-type and a wild-type turkey line. *Poult Sci*, 95(4), 901-911.
- Iqbal J, Bhutto AL, Shah MG et al. (2014).** Gross anatomical and histological studies on the liver of broiler. *J Appl Environ Biol Sci*, 4, 284-295.
- Katz NR (1992).** Metabolic heterogeneity of hepatocytes across the the liver acinus. *J Nutr*, 122, 843-849.
- Klein RM, Enders GC (2007).** In "Anatomy, Histology, And Cell Biology Pretest 'm Self-Assessment and Review", 3rd ed., 29-31, McGraw-Hill Companies, New York.
- Mert N (1997).** *Veteriner Klinik Biyokimya*. 230-240, Ceylan Matbaacılık, İstanbul.
- Quentin M, Bouvrel I, Picard M (2005).** Effects of crude protein and lysine contents of the diet on growth and body composition of slow-growing commercial chickens from 42 to 77 days of age. *Anim Res*, 54, 113-122.
- Sarkarati F, Doustar Y (2012).** The frequency of liver lesions of broilers slaughtered in Tabriz abattoir. *Ann of Biol Res*, 3, 3439-3443.
- Schmidt RE, Reavill DR, Phalen DN (2003).** In "Pathology of pet and aviary birds". 1st ed., 67-68, Blackwell Publishing Company, Iowa State Press, Iowa.
- Tasci SK, Deprem T, Bingol SA, Akbulut Y (2018).** The anatomical and histological structures of Buzzard's (*Buteo buteo*) small intestine and liver, and immunohistochemical localization of catalase. *Kafkas Üni Vet Fak Derg*, 24.
- Whitlow GG (2000).** In "Gastrointestinal Anatomy and Physiology (Avian Physiology)". 5th ed., 299-304, Academic Press, Honoiuila, Hawaii.





Antimicrobial Activity of Boric Acid Solution Against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*

Ziya İLHAN¹ İsmail Hakkı EKİN² Özgül GÜLAYDIN²

¹ Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Balıkesir, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, Van, Turkey

Received: 08.05.2019

Accepted: 06.11.2019

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the antibacterial effects of boric acid (H_3BO_3) against *Listeria (L.) monocytogenes* and *Staphylococcus (S.) aureus*. The antibacterial effects of boric acid were analyzed according to the recommendations of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Minimum inhibitory concentrations (MICs) and minimum bactericidal concentrations (MBCs) of boric acid were determined as 1/32 (1.93 mg/ml) and 1/16 (3.80 mg/ml) for *L. monocytogenes* and *S. aureus*, respectively. Therefore, it was concluded that boric acid, a by-product of boron, can be used as an alternative antibacterial agent and more detailed *in vitro* and *in vivo* studies is necessary.

Keywords: Antibacterial effect, boric acid, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

ÖZ

Borik Asitin *Listeria monocytogenes* ve *Staphylococcus aureus*'a Karşı Antimikrobiyel Etkisi

Bu çalışmada, borik asidin (H_3BO_3) *Listeria (L.) monocytogenes* ve *Staphylococcus (S.) aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi amaçlandı. Antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesinde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterleri dikkate alındı. Borik asidin minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyonu (MBK) *L. monocytogenes* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlendi. Sonuç olarak, ülkemizin önemli yeraltı zenginliklerinden bor madeninin bir yan ürünü olan borik asidin, daha ayrıntılı *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarından sonra alternatif bir antibakteriyel olarak kullanılabilceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel etki, borik asit, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Bor, doğada bileşikler halinde bulunan ve oldukça farklı alanlarda kullanılan bir elementtir. Bor ve bor ürünlerinden iletişim araçları, savunma, tekstil, tarım, cam, seramik, inşaat ve ilaç sanayisinden enerjiye kadar pek çok alanda yararlanılmaktadır (Kuru ve Yarat 2017). Bor ürünlerinden sağlık alanında ise diş, kemik, eklem ve alerjik hastalıklar ile psikiyatri, menopoz ve kanser tedavisinde yararlanılmaktadır (Demirtaş 2010; Nielsen ve Meacham 2011; Zan ve ark. 2013). Sağlık alanındaki en önemli özelliklerinden biri antibakteriyel etkisinin olmasıdır. Bu özelliğinden dolayı antibiyotik, antiseptik, sterilizasyon işlemleri ve antibakteriyel kremlerde kullanılmaktadır (Yılmaz 2012; Demirci ve ark. 2015a; Demirci ve ark. 2015b; Yakıncı ve Kök 2016). Son yıllarda tekstil sanayinde antibakteriyel özellikli nanoteknolojik kumaşların üretiminde de bor ürünlerinin kullanımıyla ilgili çalışmaların yapıldığı bildirilmektedir (Akbar ve ark. 2017).

Listeria (L.) monocytogenes hayvanlarda daha çok septisemi, meme enfeksiyonları, sinirsel semptomlar ve yavru atmalara neden olmaktadır. Etken insanlarda ise genellikle sepsis, meningoensefalitis, serebrit, febril gastroenteritis ve çeşitli fokal lezyonlardan sorumlu tutulmaktadır. Bakteri genellikle kontamine süt, süt ürünleri, et ve çiğ sebze gibi çeşitli besin maddeleriyle insanlara bulaşarak, besin kaynaklı salgınlara neden olmaktadır. Etken bu yönüyle halk sağlığı için önemli bir tehdit olarak nitelendirilmektedir (Evirgen 2005; Quinn ve ark. 2011).

Staphylococcus (S.) aureus gerek insan gerekse hayvanlarda önemli piyojenik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle *S. aureus*'un metisiline dirençli suşları (MRSA) uzun süredir ölümlü sonuçlanabilen enfeksiyonlara yol açarak, birçok insanın ölümünden sorumlu tutulmaktadır. MRSA ilk kez 1961 yılında tanımlandıktan sonra tüm dünyada önemli bir sağlık problemi olduğu anlaşılmıştır. Kısaca, birçok *S. aureus* suşunda olduğu gibi özellikle MRSA günümüzde hem

beşeri hekimlikte hem de veteriner hekimlikte önemini korumaktadır (Quinn ve ark. 2011; Şen ve Özdemir 2016). Antibiyotiklerin keşfiyle birlikte enfeksiyöz hastalıkların tedavisinde yeni bir dönem başlamış olmasına karşın, zaman içerisinde değişik nedenlere bağlı olarak bakteriler tarafından birçok antimikrobiyel maddeye karşı direnç geliştirilmiştir. Günümüzün önemli halk sağlığı sorunlarından olan antimikrobiyel madde dirençliliği, yeni kuşak maddelerin kullanımını zorunlu hale getirmiştir. Mikroorganizmalarda gelişen değişik antimikrobiyel madde dirençlilik mekanizmalarıyla, hastane kaynaklı enfeksiyonlar olarak adlandırılan yeni sağlık problemleriyle son zamanlarda daha fazla karşılaşılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu çalışmada, önemli sağlık sorunlarına neden olan ve zamanla çeşitli antimikrobiyel maddelere karşı direnç geliştiren *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı, Dünya'daki en önemli rezervleri ülkemizde bulunan bor madeninin bir yan ürünü olan borik asidin antibakteriyel etkinliğinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bakteri Suşları

Çalışmada, Balıkesir Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ile Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Kültür Koleksiyonlarından sağlanan *L. monocytogenes* (ATCC® 7644) ve *S. aureus* (ATCC® 25923) suşları kullanıldı.

Bakteri Sulandırmalarının Belirlenmesi

Bakteri kültürlerinden Brain Heart Infusion Broth'a (BHIB, pH: 7.2) (299070, BD, France) ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24-48 saat inkube edildi. Üreyen bakteri kültürlerinden çizme yöntemiyle Brain Heart Infusion Agar'a (BHIA, pH: 7.2) (53286, BD, France) pasaj yapılarak, kültürlerin saflık kontrolleri yapıldı. BHIB'ta üreyen saf bakteri kültürlerinden alınarak, steril fizyolojik tuzlu suda (FTS, pH: 7.2), log₂ tabanına göre 10 katlı sulandırmalar yapıldı. Her sulandırmadan 2 adet BHIA'a ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24 saat inkube edildi. Üreyen koloniler çıplak gözle sayılarak, cfu/ml olarak sayıları saptandı. Böylece yaklaşık olarak McFarland Standart Tüp No: 0.5 yoğunluğunda bakteri sulandırmaları belirlendi (Arda 1985).

Borik Asidin Minimal İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) ve Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunun (MBK) Belirlenmesi

Borik asidin MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesinde National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kriterleri dikkate alındı (NCCLS 2000). Çalışmada ticari borik asit (H₃BO₃, M: 61.83 g/mol) (A2940, Applichem, Darmstadt, Germany) kullanıldı. MBK amacıyla borik asit içeren FTS ile dilue edilen bakteri sulandırmalarının her birinden 2 adet BHIA'a ekimler yapılarak, 37°C'de ve aerobik ortamda 24 saat üretildi. Bakteri üremeleri çıplak gözle değerlendirildi.

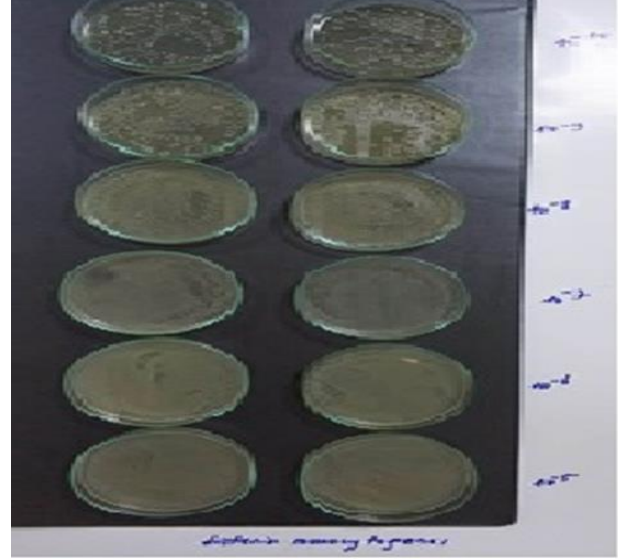
Pozitif ve Negatif Kontroller

Çalışma kapsamında pozitif kontrol olarak borik asit içermeyen bakteri kültürü (McFarland No: 0.5), negatif kontrol olarak ise bakteri içermeyen steril distile su kullanıldı ve değerlendirmeler aynı şekilde çıplak gözle yapıldı.

BULGULAR

Bakteri Sulandırmaları

Teste kullanılan bakteri sulandırmaları *L. monocytogenes* için 2.4X10⁶ cfu/ml, *S. aureus* için ise 1.8X10⁶ cfu/ml olarak belirlendi (Şekil 1 ve 2).



Şekil 1. Log₂ tabanına göre 10 katlı dilusyonu yapılan *L. monocytogenes* (BHIA).

Figure 1. 10 fold dilution of *L. monocytogenes* based on log₂ (BHIA).

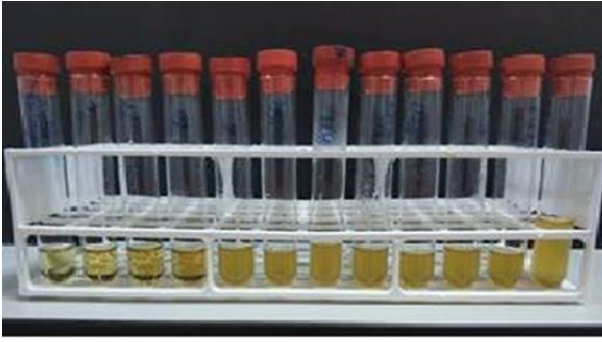


Şekil 2. Log₂ tabanına göre 10 katlı dilusyonu yapılan *S. aureus* (BHIA).

Figure 2. 10 fold dilution of *S. aureus* based on log₂ (BHIA).

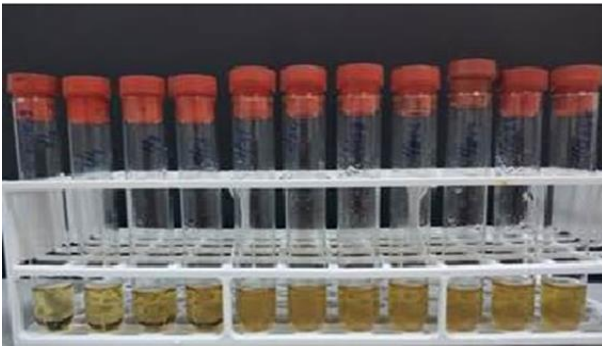
Borik Asidin MİK ve MBK Değerleri

Borik asidin MİK ve MBK konsantrasyonu *L. monocytogenes* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlendi (Şekil 3 ve 4) (Tablo 1).



Şekil 3. Borik asidin *L. monocytogenes* üzerine MİK göstergesi.

Figure 3. MIC values of boric acid for *L. Monocytogenes*.



Şekil 4. Borik asidin *S. aureus* üzerine MİK göstergesi

Figure 4. MIC values of boric acid for *S. aureus*

Tablo 1. Borik asidin *L. monocytogenes* ve *S. aureus* üzerine olan MİK değerleri

Table 1. MIC values of boric acid for *L. monocytogenes* and *S. aureus*

Bakteri türü	Sulandırma oranı	Borik asit miktarı (mg/ml)	Molarite	Normalite
<i>L. monocytogenes</i>	1/32	1.93	0.03125	0.09375
<i>S. aureus</i>	1/16	3.80	0.0626	0.1875

TARTIŞMA ve SONUÇ

İlk antibiyotiğin Alexander Fleming tarafından keşfinden itibaren çeşitli bakteriler, farklı antibiyotiklere karşı direnç geliştirmiştir (Quinn ve ark. 2011). Dünya Sağlık Örgütü yayımladığı bildirilerle yeni antibiyotiklerin keşfedilmemesi durumunda çok önemli sağlık sorunlarının yaşanabileceğine dikkat çekmektedir (WHO 2014). Bu nedenle çalışmamız, bor madeninin Dünya'daki en önemli rezervi konumundaki ülkemize ait bu elementin bir yan ürünü olan borik asidin *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesine yönelik bir ön çalışma olarak gerçekleştirildi.

Bor ve bor ürünleri sağlık alanında antimikrobiyel özelliğinden dolayı antiseptik olarak lens solüsyonlarında, kremlerde, gargara ve göz damlaları gibi birçok tıbbi ürünün bileşiminde bulunmaktadır (Baker ve ark. 2009; Demirci ve ark. 2015b; Kuru ve Yarat 2017).

Diğer yandan kemik ve eklem hastalıklarıyla, alerjik hastalıklar, yanık tedavileri, yara iyileşmesi, psikiyatri ve menopoz tedavileriyle nükleer tıpta borla nötron aranması

gibi oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır (Baker ve ark. 2009; Nielsen ve Meacham 2011; Yakıncı ve Kök 2016; Kuru ve Yarat 2017). Borik asit ise genellikle antiseptik, böcek ilacı ve koku gidericilerde kullanılan, suda çözünen, kokusuz ve beyaz renkli kristallerden oluşan inorganik bir maddedir. Antibakteriyel özelliğe sahip olan borik asit, Wilhelm Holmberg tarafından bulunmuş olup, sülfürik asidin yan ürünü olarak ortaya çıkmıştır (Haesebrouck ve ark. 2009; Yılmaz 2012).

Dünyanın farklı bölgelerinde çeşitli bakterilere karşı yoğun olarak yeni antibakteriyellerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir (Concia ve ark. 2016). Bazı araştırmacılar ise borik asidin aktibakteriyel etkinliğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirmiştir. Haesebrouck ve ark. (2009), %2'lik borik asit ve %2'lik asetik asitin eşit miktarlarda karıştırılmasıyla elde edilen solüsyonun 1/2 ve 1/4'lük sulandırmalarında, 5×10^7 cfu/ml miktarındaki *S. pseudintermedius*'u 30 dakikada inaktive ettiğini, borik asidin söz konusu aktivitesi için asetik asitle birlikte kombine edilmesinin daha etkili sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Ülkemizde insanlarda yapılan bir çalışmada, ağıza uygulanan borik asit solüsyonunun *Enterococcus faecalis* üzerine güçlü aktibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (Zan ve ark. 2013). Yılmaz (2012), borik asit ve boraksın *S. aureus*, *Acinetobacter septicus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı MİK ve MBK değerlerini sırayla 3.80 mg/ml, 3.80 mg/ml, 7.60 mg/ml ve 7.60 mg/ml olarak saptadığını bildirmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışmada, borik asidin MİK ve MBK değerleri *L. monocytogene* için 1/32 (1.93 mg/ml), *S. aureus* için ise 1/16 (3.80 mg/ml) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen borik asitin *S. aureus* üzerine olan antibakteriyel etki değeriyle, Yılmaz (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmadan elde edilen değer, birbiriyle benzerlik göstermektedir. Bu durum, borik asitin *S. aureus* üzerine olan antibakteriyel etkinliğinin 3.80 mg/ml olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada *L. monocytogenes* için belirlenen antibakteriyel etkinliğin *S. aureus*'a göre düşük değerde bulunması, *L. monocytogenes*'in *S. aureus*'a göre borik asidin antibakteriyel etkinliğine daha duyarlı olması veya *S. aureus*'un hücre yapısının daha güçlü olmasıyla açıklanabilir.

Sonuç olarak, önemli insan ve hayvan patojenleri olan *L. monocytogenes* ve *S. aureus*'a karşı borik asidin antibakteriyel etkinlik bakımından önemli bir potansiyele sahip olduğu, bu nedenle farklı bakteri türlerini içeren daha ayrıntılı *in vitro* ve *in vivo* çalışmaların yapılmasının faydalı olacağı kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Akbar W, Noor MR, Kowal K, Syed T, Soulimane T, Basim GB (2017). Characterization and antibacterial properties of nanoboron powders and nanoboron powder coated textiles. Adv Powder Technol, 28 (2), 596-610.
- Arda M (1985). Genel Bakteriyoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi, 3. Baskı, Ankara.
- Baker SJ, Ding CZ, Akama T, Zhang YK, Hernandez V, Xia Y (2009). Therapeutic potential of boron-containing compounds. Future Med Chem, 1 (7), 1275-1288.
- Concia E, Mazzaferrri F, Cordioli M (2016). New antibiotic development: Barriers and opportunities. Ital J Med, 10, 255-271.
- Demirci S, Doğan A, Karakuş E ve ark. (2015a). Boron and poloxamer (F68 and F127) containing hydrogel formulation for burn wound healing. Biol Trace Elem Res, 168 (1), 169-180.
- Demirci S, Kaya MS, Doğan A ve ark. (2015b). Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite. Turk J Biol, 39 (3), 417-426.
- Demirtaş A (2010). Bor'un insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemi. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg, 41 (1), 75-80.

- Evirgen Ö (2005).** *Listeria monocytogenes* infeksiyonu; Kliniği, tanı ve tedavi özellikleri. Van Tıp Derg, 12 (1), 32-35.
- Haesebrouck F, Baele M, De Keyser H, Hermans K, Pasmans F (2009).** Antimicrobial activity of an acetic and boric acid solution against *Staphylococcus pseudintermedius*. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 78 (2), 89-90.
- Kuru R, Yarat A (2017).** Bor ve sağlığımıza olan etkilerine güncel bir bakış. Clin Exper Health Sci, 7 (3), 107-115.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2000).** Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved-standard fifth edition, Wayne (PA).
- Nielsen FH, Meacham SL (2011).** Growing evidence for human health benefits of boron. JEBCAM, 16 (3), 169-180.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, Fitzpatrick ES (2011).** Veterinary Microbiology and Microbial Disease, Wiley-Blackwell, 2nd Edit, Dublin.
- Şen E, Özdemir H (2016).** *Staphylococcus aureus*'un antibiyotik dirençliliği ve halk sağlığı açısından önemi. Elektronik Mikrobiyoloji Derg, TR, 14 (1), 20-35.
- Yakıncı ZD, Kök M (2016).** Borun sağlık alanında kullanımı. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi, 4 (1), 36-44.
- Yılmaz MT (2012).** Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. Turk J Med Sci, 42 (Sup. 2), 1423-1429.
- World Health Organization (WHO) (2014).** Antimicrobial Resistance Global Report On Surveillance. [www.http://file:///C:/Users/Veteriner/Downloads/9789241564748_eng%20\(1\).pdf](http://file:///C:/Users/Veteriner/Downloads/9789241564748_eng%20(1).pdf) (Erişim: 4 Mart 2019).
- Zan R, Hubbezoglu I, Ozdemir AK, Tunç T, Sumer Z, Alıcı O (2013).** Antibacterial effect of different concentration of boric acid against *Enterococcus faecalis* biofilms in root canal. Marmara Dental J, 1 (2), 76-80.



Evaluation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukins (IL-6, IL-8) and C-reactive protein (CRP) levels in neonatal calves with presumed septicemia

Yakup AKGÜL¹ Ömer AKGÜL² Süleyman KOZAT¹ Cumali ÖZKAN¹
Abdullah KAYA¹ Nedim YILMAZ³

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Van, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiolog, Van, Turkey

³ Van Metropolitan Municipality, Department of Animal Health, Van, Turkey

Received: 13.06.2019

Accepted: 15.10.2019

ABSTRACT

In this study; intercellular molecule-1 (ICAM-1), Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) and C-reactive protein (CRP) levels were evaluated in neonatal calves with presumed septicemia. The material of this study consisted of a total of 30 calves. Study group consisted of 20 septicemic calves and 10 clinically healthy calves and with same breed and weight and their ages were between 1 and 10 days. The statistical analysis indicated that leukocyte (WBC), red blood cell (RBC), hematocrit (Hct) hemoglobin (Hb) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) values in neonatal calves with presumed septicemia were higher than those of the control group ($P<0.05$), whereas PLT values of neonatal calves with septicemia were lower than those of the control group ($P<0.05$). The levels of ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP values in septicemic calves were higher than those of the control group ($P<0.05$). As a result, it was concluded that analyzes of TNF- α , IL-6, IL-8 and particularly ICAM-1 concentrations may be considered in evaluating the severity and prognosis of patients with septicemia, as well as monitoring the efficacy of the treatment of the disease.

Keywords: Calf, Septicemia, Acute Phase Proteins, Cytokines, Intercellular adhesion molecule-1

öz

Septisemi Şüpheli Yenidoğan Buzağlarda Hücrelerarası Adhezyon Molekül-1 (ICAM-1), Tümör nekroz faktörü α (TNF- α), İnterlökinler (IL-6, IL-8) ve C-reaktif protein (CRP) Seviyelerinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada; septisemi şüpheli yenidoğan buzağlarda hücreler arası molekül-1 (ICAM-1), Tümör nekroz faktörü α (TNF- α), İnterlökin-6 (IL-6), İnterlökin-8 (IL-8) ve C-reaktif protein (CRP) düzeyleri değerlendirildi. Bu çalışmanın materyalini aynı cins ve kiloya sahip ve yaşları 1-10 gün arasında değişen 20 septisemik buzağı ile 10 sağlıklı buzağı olmak üzere toplam 30 buzağı oluşturdu. İstatistiksel analizde, septisemili buzağların lökosit (WBC), eritrosit (RBC), hematokrit (Hct) hemoglobin (Hb) ve ortalama korpüsküler hemoglobin konsantrasyonu (MCHC) değerleri kontrol grubunun aynı parametrelerine göre yüksek tespit edilirken ($P<0.05$), septisemili yenidoğan buzağların PLT değerleri kontrol grubunun PLT değerlerine göre düşük ($P<0.05$) saptandı. Septisemik buzağlarda ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 ve CRP değerleri kontrol grubunun aynı değerlerine göre anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi ($P<0.05$). Sonuç olarak, TNF- α , IL-6, IL-8 ve özellikle ICAM-1 konsantrasyonlarının analizlerinin septisemili vakalarda hastalığın şiddetini ve prognozunu değerlendirmede yararlı parametreler olabileceği, bununla birlikte bu parametrelerin tedavi etkinliğinin takibinde göz önünde bulundurulması gereken parametreler olacağı kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Septisemi, Akut Faz Proteini, Sitokin, Hücre arası Adhezyon Molekül-1

INTRODUCTION

The neonatal period is one of the most critical stage in the development of farm animals, because morbidity and mortality rates of various diseases are highest during this period (Hammon et al. 2013). There are lots of factors that

leads to yield loss and death in neonatal calves such as bacterial, viral, protozoal agents, environmental stressors and other diseases. These factors can result in serious economic losses (Bellows 2007). Among these etiological factors, septicemia in calves may also develop by passive transfer failure and exposure to invasive infectious agents

(Basoglu et al. 2004; Kozat 2018). Septicemia is the entrance of microorganisms and toxins into blood flow and coexisting of general inflammation with host response (Karadal 2009). Infectious agents, such as bacteria, viruses, and fungi are the ones that begin with the stimulation of the immune system and lead to death as a result of multiple organ failure (Camcıoğlu and Aytac 2007). Although there have been several studies on septicemia in humans and animals at the present, the subject of pathophysiology of the disease has not yet been clarified at the desired level. In this context, sufficient information related with the function of a large number of endogenous mediators emerging within the septicemia process has not been achieved in ongoing studies. For this reason, performing advanced diagnostic methods and advanced techniques of treatment has not been able to provide the desired results. Intensive studies on the function of these mediators in the inflammatory process caused by septicemia are still on going. A number of mediators with different functions such as interleukins, polymorphonuclear cell complexes, interferons, macrophages, arachidonic acid metabolites, toxic oxygen metabolites occur after the initiation of the inflammation (Austgulen et al. 1997; Akgul et al. 2019). With the passage of microorganisms or toxins through the epithelial layer and into the subepithelial tissue, existing monocytes and macrophages recognize non-indigenous microorganisms entering the body and send the necessary signals to the adhesion molecules in the environment. This signaling event begins to release many cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-8 (Lofstedt et al. 1999; Basoglu et al. 2004; Ercan et al. 2014). Indeed, according to related studies; cytokines reach the highest levels in blood plasma and serum within 60-180 minutes during the development of bacteriemia and endotoxemia (Hack et al. 1989; Wakabayashi et al. 1991). High levels of cytokines are currently used in early detection of septicemia in newborns and adults (Waage et al. 1989; Bone et al. 1992; Lofstedt et al. 1999; Basoglu et al. 2004; Ercan et al. 2014). The release of cytokines varies depending on the type of pathogens (bacteria or viruses etc.) (Akgul et al. 2019; Steel and Whitehead, 1994; Ercan et al. 2014). Increase in cytokines, especially IL-1, IL-6, and TNF- α 1, in acute and chronic inflammatory events causes a release of acute phase proteins in the liver (Gökçe and Bozukluhan 2009; Ceciliani et al. 2012; Akgul et al. 2019). Adhesive molecules are molecules that act in cellular and cell-matrix interactions, and are released from endothelial cells, mononuclear cells and granulocytes. The appearance of these molecules on the surface of the cell takes about 2-4 hours (Barlow and Huntley 2000). They continue to exist and increase within 12-16 hours and maintain their presence for about 24-72 hours with continued stimulation of cytokines in the environment (Adams et al. 1990; Endo et al. 1995; Austgulen et al. 1997; Horadagoda et al. 2002). Adhesion molecules play an important role in the development of immunity and inflammatory response. Cells involved in the protection of the body exit the veins and go into the interstitial tissues and adhere to foreign microorganisms and destroy these microorganisms with a cytotoxic effect. This process is due to adhesion molecules (Mackay and Imhof 1993; Akgul et al. 2019). Numerous studies have been carried out on the importance of cytokines, acute phase proteins and adhesion molecules used in identifying septicemia in humans and animals (Hack et al. 1989; De Bont et al. 1993; Deveci et al. 2002; Lee et al. 2003; Petersen et al. 2004). Although the significance of these metabolic stimulants is not known in the course of the disease, information on the effectiveness of the diagnosis is still limited. Despite the fact that a large

number of parameters can determine the activity of inflammation, this is not enough to control the effect on patients and the response to treatment for serious disease patterns. Okusawa et al. (1988) have proven that TNF- α has reached high levels. Similarly, in a study conducted by Pohlman et al. (1986) on rabbits, it was shown that TNF- α increases body heat and increases the adhesion of neutrophils. In a similar study by Rothstein and Schreiber (1988) on rats; it has been shown that systemic toxemia occurs when low doses of TNF- α are given to healthy rat, and a lethal shock occurs when TNF- α is given along with various bacteria. Dinarello (1991) indicated that adhesion molecules, as well as conventional methods of treatment, can be used in animals subjected to septic shock. Wakabayashi et al. (1991) reported that a significant increase in TNF- α levels was observed in bacteremia caused by *E. coli* and *S. epidermidis*, and necrosis of the liver, which developed simultaneously with leukopenia, thrombocytopenia, hypotension and infiltration of neutrophils. Basoglu et al. (2004) studied serum TNF- α levels in neonatal septicemic calves and determined TNF- α serum levels of healthy calves as 234 \pm 115 pg/ml, and the levels in septicemic calves were 3.380 \pm 699 pg/ml. In addition, the researchers suggested that the level of TNF- α should be above 464 pg/ml in septicemic calves in order to be positive. In another study performed by Barton and Collates (1999), TNF- α and IL-6 levels increased to 213 \pm 548 μ g/ml and 3.018 \pm 8.022 μ g/ml, respectively. Nevertheless, Morris et al. (1990; 1992) indicated that IL-6 levels increased in endotoxemia cases, and this increase was in parallel with the clinical data and laboratory parameters of the disease. Again, in a study conducted by MacKay et al. (1991) on endotoxemic horses; it was found that TNF- α levels increase during the course of the disease. Regarding acute phase proteins, Bayraktar et al. (2005) conducted a study on brucellosis in cattle, expressed the idea that the levels of CRP can be used as a supplement to the diagnosis. Likewise, Lee et al. (2003) stated that CRP reaches a high level in infections. Similarly, Bozukluhan et al. (2016) found in studies of cattle infected with brucella, that CRP levels were increased.

Kozat and Özkan (2018) reported an increase in ICAM-1 concentrations in calves infected with *M. bovis*. With respect to this topic, Cowley et al. (1994) found that serum ICAM-1 levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) were high. In the same study, it was found that ICAM-1 levels were higher in patients with multiple organ failure. Again in a similar study Kayal et al. (1998) reported that ICAM-1 levels in patients with septicemia increased in plasma in parallel with the development of multiple organ failure. Similarly, in a study by Sessler et al. (1995), it was found that the level of ICAM-1 in serum was significantly higher in moribund patients with septic shock than in patients who survived. Similarly, Deveci et al. (2002) found that serum levels of ICAM-1 in septicemic children were an important predictor of diagnosis and prognosis of the disease. In the same way, Endo et al. (1995) expressed the view that the prognosis was poor in patients with multiple organ failure due to septicemia and high levels of ICAM-1, and adhesion molecule levels rapidly declined during healing as a result of treatment. In another study, Whalen et al. (2000) reported a significant increase in ICAM-1 levels in blood samples in children with multiple organ failure due to septicemia. Similarly, in a study conducted by Austgulen et al. (1997); the levels of ICAM-1 in neonatal septicemic children are high and can be used to diagnose the disease. As can be understood from the studies, it has been

reported that levels of ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP may contribute to the early diagnosis of septicemia and mortality (Adams et al. 1990; De Bont et al. 1993; Austgulen et al. 1997; Deveci et al. 2002). The main goal of this study is to determine the levels of ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP which are useful in diagnosis and prediction of calf septicemia.

MATERIALS and METHODS

The study material was collected from a total of 30 calves, 10 healthy and 20 septic calves aged 1 to 10 days, delivered to the clinics of Veterinary Faculty of Yuzuncu Yil University. All calves were evaluated according to body temperatures, changes in general condition, respiratory and heart rates, appetite, environment, reflection to the current situation, the presence of diarrhea, changes in mental status and dehydration. In addition to these findings, calves that did not receive any medication included to the study. This research was approved (21/05/2015 and 27552122-295) by the Animal Research Ethics Committee of Van Yuzuncu Yil University in Van, Turkey.

Analysis of hematological parameters

To analyze hematological parameters according to the procedure, blood samples taken from the jugular vein in both healthy and septicemic calves was placed in anticoagulant tubes. Hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb) concentration, leukocyte count (WBC), red blood cells (RBC), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) and platelet count (PLT) were analyzed at the same day (QBC Vetautoreader®-Idexx).

Analysis of biochemical parameters

To analyze the biochemical parameters, blood samples was taken from the jugular vein from both healthy and septicemic calves and placed in coagulant free tubes and centrifuged at room temperature at 3000 rpm/10 min for the removal of serum (Rotofix32®-Hettich). From the obtained sera, ICAM-1 (catalog number MBS017452), TNF- α (catalog no: MBS2611057), IL-6 (Interleukin 6, catalog no: MBS887062), IL-8 (catalog no: MBS008105) and CRP (catalog no: MBS887532) concentrations were measured by ELISA device (DAS, Italy) according to the kit procedures.

Analysis of microbiological agents

For microbiological analysis, blood samples from the jugular vein of both healthy and calves with septicemia

were taken on condition that they were not in contact with air and 5-10 ml of blood in each tubes were placed in 30 ml bottles with aerobic and anaerobic cultures (Bact/Alert®). Blood culture bottles containing blood samples were sent to the Microbiology Laboratory of the Medical Faculty of Yuzuncu Yil University for bacteriological identification and placed in device for Blood Culture (Bact/Alert® 3D Left Combination Module). For bacteriological isolation, aerobic (sheep bloody agar, McConkey agar and Eosin Methylene Blue Agar-Salubris®) and anaerobic (Shadler liquid medium and Anaerob Agar-Salubris®) nutrient media were used. The performed factor analysis showed that the presence of septicemia is final. The isolated bacteria were identified by automated microbiological systems BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) at the level of the genus and species and the results of the antibiogram analysis were presented.

Descriptive statistics for the studied features are presented as mean and standard deviation. The Independent two-sample t-test was used to compare groups for these characteristics. For all statistical analyses, IBM SPSS ver. 20 software was used.

RESULTS

Clinical findings

According to clinical examination of healthy animals, there were no health problems, and the body condition was in normal level depending on age and sex. Body temperatures of healthy calves were determined as 37.86 ± 1.32 °C. Body temperatures of septicemic calves was found as 38.40 ± 2.10 °C. However, it was also found that dehydration, weakening of the suction reflex and diarrhea were most common, while the vast majority of the calves in the severe group were lying down, completely lost interest to the environment, had decreased suckling reflex, changes in mental status and strong dehydration.

Results of hematological parameters

In this study, hematological parameters of septicemic calves are presented in Table 1.

In statistical analysis, WBC, RBC, Hct, Hb and MCHC values of neonatal calves with septicemia were higher than those of the control group ($P < 0.05$), whereas PLT values of neonatal calves with septicemia were lower than those of the control group ($P < 0.05$).

Table 1. Hematological parameters in healthy and calves with septicemia

Parameter	Control group (n=10) $\bar{x} \pm SD$	Septicemia group (n=20) $\bar{x} \pm SD$
WBC ($10^3/\text{mm}^3$)	13.79 \pm 3.41 ^a	27.67 \pm 12.10 ^b
RBC ($10^6/\text{mm}^3$)	9.95 \pm 1.38 ^a	10.25 \pm 2.43 ^b
Hct (%)	37.88 \pm 3.86 ^a	41.49 \pm 11.105 ^b
Hb (g/dl)	11.96 \pm 1.27 ^a	13.63 \pm 3.10 ^b
MCHC (g/dl)	31.53 \pm 1.38 ^a	33.39 \pm 5.14 ^b
PLT ($10^3/\text{mm}^3$)	302 \pm 16 ^a	250 \pm 18 ^b

$\bar{X} \pm SD$: mean \pm standart deviation.

a, b: Different lower cases in the same column represent statistically significant differences ($P < 0.05$).

Table 2. Serum ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP levels in healthy and calves with septicemia

Parameter	Control group (n=10) $\bar{x}\pm SD$	Septicemia (n=20) $\bar{x}\pm SD$
ICAM-1 (ng/L)	414.77 \pm 266.10 ^a	1205.225 \pm 450.10 ^b
TNF- α (ng/L)	306.53 \pm 87.21 ^a	469.10 \pm 15.10 ^b
IL-6 (ng/L)	538.77 \pm 259.98 ^a	1101.81 \pm 313.85 ^b
IL-8 (ng/L)	66.40 \pm 46.37 ^a	217.27 \pm 93.39 ^b
CRP (ng/L)	13.64 \pm 3.68 ^a	24.19 \pm 7.51 ^b

$\bar{X}\pm SD$: mean \pm standart deviation.

a, b: Different lower cases in the same column represent statistically significant differences (P<0.05).

Results of biochemical parameters

Biochemical results are presented in Table 2. ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP values in septicemic calves were higher than those of the control group (P<0.05).

Results of microbiological parameters

According to the results of blood culture tests *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumonia*, *Campylobacter fetus*, *Salmonella spp.* and *Bacillus spp.* were isolated and identified.

DISCUSSION

Despite numerous studies in the treatment of neonatal calf diseases were undertaken, a high mortality rate for these diseases remains an important problem (Çitil and Gökçe, 2013, Kozat and Tuncay, 2018). In this regard, high mortality and serious economic losses occur in our country, especially after calf birth (Çakıroğlu et al. 2010; Çitil and Gökçe, 2013; Kozat, 2018). In this context, sepsis is known as a fatal disease, because of the rapid onset of septicemia and the septic shock that causes multiple organ failure. For this reason, this disease has become an important subject that many researchers are currently considering. In this context, studies on early diagnosis and treatment of this disease have continued to reduce high mortality in neonates (Michaels and Banks 1988; Gerros et al. 1995; Doellner et al. 1998; Doellner et al. 2001).

The number of red blood cells can be reduced in the process of the disease, and sepsis becomes more noticeable in a prolonged inflammatory process. In fact, according to various studies, important changes in the blood profile may occur in neonatal septicemic calves (Gerros et al. 1995; Lofstedt et al. 1999). However, it has also been reported that there cannot be a rapid change in erythrocyte levels during the first 72 hours of infection (Weinberg et al. 1988; Barton and Collates 1999; Deveci et al. 2002; Basoglu et al. 2004). Similarly, it was noted that in this study there was significant change in the level of red blood cells, since both groups of patients were at the initial stage of infection (Table 1). On the other hand, WBC, RBC, Hct, Hb and MCHC values of neonatal calves with septicemia were higher than those of the control group (P<0.05), whereas PLT values of neonatal calves with septicemia were lower than those of the control group (P<0.05). It was found that changes and increase in total leukocyte counts are consistent with previous studies (Lofstedt et al. 1999; Deveci et al. 2002; Basoglu et al. 2004; Ercan et al. 2014).

In parallel with changes in the blood profile of septic animals, clinical data soon begin to appear in sick animals (Adams et al. 1990; Gerros et al. 1995; Barton and Collates 1999; Horadagoda et al. 2002). In these animals, symptoms such as alterations in body temperature, tachycardia, depression, loss of appetite, loss of suckling reflex and changes in mental status are considered to be major clinical symptoms (Michaels and Banks 1988, Gerros et al. 1995, Lofstedt et al. 1999, Basoglu et al. 2004). Similarly, findings obtained in this study supports the datas of the above researchers.

A number of studies on the process of septicemia in humans (Dinarelo 1991; Deveci et al. 2002;) and animals (Bozukluhan et al. 2016) have been carried out, which have shown that several microorganisms activate a large number of adhesion molecules, cytokines and acute phase proteins after they enter the body (Adams et al. 1990; Ay et al. 1998; Bayraktar et al. 2005; Kozat and Ozkan 2018). In this study, the level of the stated mediators (ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8, and CRP) in blood plasma or serum after infection with microorganisms in neonatal calves infected with sepsis was observed to determine to what results this would lead. In this context, numerous studies have been conducted in human medicine, where the ICAM-1 adhesion molecule plays an important role in many stages of the inflammatory process (Austgulen et al. 1997; Ay et al. 1998; Deveci et al. 2004; Terekeci et al. 2008).

There are several studies showing that ICAM-1 may be an important diagnostic marker for septic diseases in human medicine (Cowley et al. 1994; Endo et al. 1995; Deveci et al. 2004; Terekeci et al. 2008). Sessler et al. (1995) reported that ICAM-1 levels markedly increased in patients with septic shock. Cowley et al. (1994) found that in patients with systemic inflammatory response syndrome, ICAM-1 serum levels were significantly increased. The same researchers stated that ICAM-1 levels were present in high concentrations in patients with multiple organ failure. In a similar study, Kayal et al. (1998) showed that ICAM-1 levels increase in plasma in patients with sepsis in parallel with the syndrome of multiple organ failure. Similarly, in a study conducted by Endo et al. (1995); it was suggested that the prognosis is worsened in patients with multiple organ failure due to septicemia and high levels of ICAM-1, and adhesion molecule levels rapidly declined during healing as a result of treatment. Whalen et al. (2000) reported a significant increase in ICAM-1 levels in blood samples in children with multiple organ failure due to septicemia. Similarly, in a study conducted by Austgulen et al. (1997); the levels of ICAM-1 in neonatal septicemic children are high and can

be used for diagnosing the disease. However, there are also studies suggest that ICAM-1 cannot be used as a single marker in patients with septicemia (Cowley et al. 1994; Deveci et al. 2002). Although ICAM-1 is the subject of several studies in the field of human medicine, there are not enough studies related with this subject in veterinary field (Kozat and Ozkan 2018). In this study, it was found that significant changes in the level of adhesion molecules occurred within the first 24-48 hours from the onset of infection in calves with septicemia and that these changes may be used to diagnose the disease. However, it was concluded that early treatment of septicemia and related scientific research in this direction could prevent the disease.

It is understood that various studies have been conducted in different parts of the world regarding the levels of cytokines in the development of septicemic diseases in animals (Horadagoda et al. 2002; Basoglu et al. 2004). In these studies, several cytokines and acute phase proteins were shown to be important for the diagnosis of the disease (Adams et al. 1990; Waage et al. 1989; Barton and Collates 1999; Akgul et al. 2019). It is emphasized that these mediators are especially important for TNF- α , IL-6 and IL-8, and that these mediator levels increase in septic human diseases (Martin et al. 2001; Mehr et al. 2001). Despite detailed studies of cytokine levels are present for the treatment of septicemic diseases in human medicine (Martin et al. 2001; Mehr et al. 2001), research on this topic in animal medicine is still at an insufficient level. On the topic of animal diseases, Murtaugh et al. (1996) found that, cytokines such as IL-6, IL-8 and TNF- α increase in animal diseases. Similarly, in another study conducted by Dandona et al. (1994) following the administration of endotoxins to experimental animals, they found that TNF- α and IL-6 levels increased within the first 2-3 hours and continued to grow to 4 hours, but after 24 hours plasma levels were too low to measure. Natanson et al. (1989) studied endotoxemia in dogs and found a rise in TNF- α concentrations. In a similar way, Barton and Collates (1999) studied the level of cytokine changes in horses with detected endotoxemia and reported an increase in TNF- α and IL-6 levels. Besides, Nakajima et al. (1997) studied coliform bovine mastitis and found that plasma levels of TNF- α and IL-6 were significantly higher than those in the control group. Similarly, in an experimental study conducted by Horadagoda et al. (2002) on calves, it was reported that the serum TNF- α level reached the highest level in the first hour of *P. haemolytica* infection, but then quickly fell to an undetectable level within 4 hours. Caswell et al. (1998) found that, in cattle with pneumonia, IL-8 levels in bacterial and viral pneumonia were measured and IL-8 levels found in patients with bacterial origin were significantly higher than levels in patients with viral origin. Adams et al. (1990) found a marked increase of TNF- α level in cases of endotoxemia developing in calves. Similarly, in a study by Fischer et al. (2016) for calf diarrhea an increase of IL-6 was demonstrated. Basoglu et al. (2004) reported that, serum TNF- α levels in newborn septicemic calves were higher than healthy calves. Besides, Ercan et al. (2014) conducted a study of blood parameters and biomarkers in newborn calves; it was reported that they measured TNF- α and IL-8 concentrations as 0.667 ± 0 ng/ml and 199.1 ± 8.4 pg/ml, respectively.

It seems that most detailed and extensive studies have been made at the levels of mediators that result from the activity of microorganisms with septicemic diseases

developing in newborn calves. Thus, at the time of planning this study, there was not any detailed study found related with the function and levels of TNF- α , IL-6, IL-8, ICAM-1 and CRP during inflammations, particularly severe disease period and concurrent septic shock. It is thought that performing a study related with this subject will fulfill the literature need. Thus, in this research, changes of inflammatory mediators in the disease process of calves following birth were studied. In this study, the levels of ICAM-1, TNF, IL-6, IL-8 and CRP increased in the first 24-48 hours in a group of calves with septicemia. For this reason, the values determined in the control group were not considered as initial values, and comparison with groups of sick animals was not performed. Indeed, the levels of cytokines in healthy animals were lower than those determined in this study compared to previous studies of cytokine levels in calves (Adams et al. 1989; Basoglu et al. 2004; Ercan et al. 2014).

According to the results of our study, it was found that in the group of calves with septicemia, the level of ICAM-1 was 1205.225 ± 450.10 ng/l, the level of TNF- α was 469.10 ± 15.10 ng/l, the level of IL-6 was 1101.81 ± 313.85 ng/l, IL-8 was 217.27 ± 93.39 ng/l, and CRP levels were 24.19 ± 7.51 ng/l. It was found that calves with septicemia have a higher level of these parameters compared to the results of previous studies in healthy calves. In fact, Basoglu et al. (2004) found 234 ± 115 ng/ml of TNF- α levels in healthy calves. Nakajima et al. (1997) reported 20 ng/ml for IL-6 levels in healthy calves. Ercan et al. (2014) and Molina (2005) reported that in healthy calves, the levels of IL-8 were 199.187 ± 8.433 and between 150-200 pg/ml in healthy calves.

When assessing our results from the moment of infection of the calves with septicemia, it was shown that the levels of ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CPR remained high. Results obtained in our study is similar with the results of previous studies (Waage et al. 1989; De Bont et al. 1993; Doellner et al. 1998; Hirao et al. 2000; Deveci et al. 2002; Horadagoda et al. 2002; Lee et al. 2003; Basoglu et al. 2004). However, when comparing ICAM-1 levels of patients with septicemia with our study; increased ICAM-1 levels may be used for diagnosing septicemia in calves. Similarly, Austgulen et al. (1997) found that ICAM-1 levels were 258.9 μ g/L in neonatal infants and 394.2 μ g/L in infected infants. Nevertheless, Deveci et al. (2002) found that ICAM-1 levels in healthy children were 277.9 ± 52.0 ng/ml, and ICAM levels in septic children were 855.0 ± 126.9 . In this study, it was found that ICAM-1 levels in septicemic calves were 1205.225 ± 450.10 ng/L. However, no comparison was made, because ICAM-1 levels were higher than the required values in the blood serum measurements obtained from healthy calves selected as a control group. Increase in ICAM-1 levels of septicemic calves when compared to control group supports the datas of the researchers.

CONCLUSION

As a conclusion, the results of all parameters associated with this study showed that in both human and veterinary medicine, could be used as important criteria for diagnosing septicemia. We believe that concentrations of ICAM-1, TNF- α , IL-6, IL-8 and CRP can be used in the early stages of diagnosing septicemic diseases in the calves, especially when determining prognosis and progression of disease.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed by Van Yuzuncu Yil University, Scientific Research Projects Coordination Unit, Project number 2015-VF-B302.

REFERENCES

- Adams JL, Semrad SD, Czuprynski CJ (1990). Administration of bacterial lipopolysaccharide elicits circulating tumor necrosis factor-alpha in neonatal calves. *J Clin Microbiol*, 28(5), 998-1001.
- Akgül O, Kozat S, Ozkan C, Kaya A, Akgül Y (2019). Evaluation of acute phase protein levels and some cytokine levels in pneumonic calves. *Med. Weter*, 75(3), 152-157.
- Austgulen R, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Dollner H (1997). Infections in neonates delivered at term are associated with increased serum levels of ICAM-1 and E-selectin. *Acta Paediatr*, 86(3), 274-280.
- Ay M, Gürbilek M, Vatansav H (1998). Acute phase proteins. *J Gen Intern Med*, 8(3): 125-32.
- Barlow JZ, Huntley GW (2000). Developmentally regulated expression of Thy-1 in structures of the mouse sensory-motor system. *J Comp Neurol*, 421(2), 215-233.
- Barton MH, Collates C (1999). Tumor necrosis factor and interleukin-6 activity and endotoxin concentration in peritoneal fluid and blood of horses with acute abdominal disease. *J Vet Intern Med*, 13(5), 457-464.
- Basoglu A, Sen I, Sevinc M, Simsek A (2004). Serum concentrations of tumor necrosis factor- α in neonatal calves with presumed septicemia. *J Vet Intern Med*, 18(2), 238-241.
- Bayraktar M, Bayraktar N, Bayındır Y, Durmaz R (2005). Brusellozlu hastalarda serum C-reaktif protein, demir ve ferritin düzeylerinin tanı ve izlemdeki değeri. *Antibiyotik ve Kemoterapi Derneği*, 19(2), 61-3.
- Bellows RA (2007). Factors affecting calf survival. *Range Beef Cow Symposium*, p.152.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Sibbald WJ (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, 101(6), 1644-1655.
- Bozukluhan K, Merhan O, Büyüf K, Çelebi Ö, Gökçe G (2016). Detection of the levels of some acute phase proteins in cattle with brucellosis. *Vet J Ankara Univ*, 63, 13-16.
- Camcıoğlu Y, Aytaç E (2007). Immunopathogenesis of sepsis. *J Turk Soc Intens Care*, 5, 1, 81-85.
- Caswell JL, Middleton DM, Sorden SD, Gordon JR (1998). Expression of the neutrophil chemoattractant interleukin-8 in the lesions of bovine pneumonic pasteurellosis. *Vet Pathol*, 35(2), 124-131.
- Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H (2012). Acute phase proteins in ruminants, *J Proteomics*, 75, 14, 4207-4231.
- Cowley HC, Heney D, Gearing AJ, Hemingway I, Webster NR (1994). Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. *Crit Care Med*, 22(4), 651-657.
- Çakıroğlu D, Meral Y, Pekmezci D, Onuk EE, Gökcalp G (2010). Yeni doğan buzağlarda çeşitli hematolojik ve biyokimyasal parametreler ile kolostral immun globulinler arasındaki ilişkinin belirlenmesi, *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 24, 1, 43-46.
- Çitil M, Gökçe E (2013). Neonatal septisemi, Türkiye Klinikleri *J Vet Sci*, 4, 1, 62-70.
- Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, Bohuon C (1994). Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 79(6), 1605-1608.
- De Bont E, Martens A, Van Raan J, Samson G, Fetter W, Okken A, De Leij L (1993). Tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 plasma levels in neonatal sepsis. *Pediatric Res*, 33(4), 380-383.
- Devenci U, Ayaz S, Ayaz A, Elevli M (2002). Sepsisli çocuklarda serum interselüler adezyon moleküllü-1 düzeyleri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 45, 162-168.
- Dinarello CA (1991). The proinflammatory cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor and treatment of the septic shock syndrome. *J Infect Dis*, 163(6), 1177-1184.
- Doellner H, Arntzen KJ, Haereid PE, Aag S, Austgulen R (1998). Interleukin-6 concentrations in neonates evaluated for sepsis. *J Pediatr*, 132(2), 295-299.
- Endo S, Inada K, Kasai T, Takakuwa T, Yamada Y, Koike S, Yoshida M (1995). Levels of soluble adhesion molecules and cytokines in patients with septic multiple organ failure. *J Inflamm* 46 (4), 212-219.
- Ercan N, Tuzcu N, Başbuğ O, Gök K, Işidan H, Oğrak YZ (2014). The evaluation of important biomarkers in healthy cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 20(5), 749-755.
- Fischer S, Bauerfeind R, Czerny CP, Neumann S (2016). Serum interleukin-6 as a prognostic marker in neonatal calf diarrhea. *J Dairy Sci*, 99(8), 6563-71.
- Gerros TC, Semrad SD and Proctor RA (1995). Alterations in clinical, hematological and metabolic variables in bovine neonatal endotoxemia. *Can J Vet Res*, 59(1), 34.
- Gökçe Hİ, Bozukluhan K (2009). Important acute phase proteins in farm animals and their use in Veterinary Medicine. *J Fac Vet Med Univ Dicle*, 1, 1, 1-14.
- Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Van Schijndel RS, Eerenberg-Belmer AJ, Aarden LA (1989). Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*, 74(5), 1704-1710.
- Hammon HM, Steinhoff-Wagner J, Flor J, Schönhusen U, Metges CC (2013). Lactation Biology Symposium: role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves. *J Anim Sci*, 91(2), 685-695.
- Hirao Y, Kanda T, Aso Y, Mitsuhashi M, Kobayashi I (2000). Interleukin-8-an early marker for bacterial infection. *Laboratory Medicine*, 31(1), 39-44.
- Horadagoda NU, Hodgson JC, Moon GM, Wijewardana TG, Eckersall PD (2002). Development of a clinical syndrome resembling haemorrhagic septicemia in the buffalo following intravenous inoculation of *Pasteurella multocida* serotype B: 2 endotoxin and the role of tumor necrosis factor- α . *Res Vet Sci*, 72(3), 194-200.
- Karadal AE (2009). SIRS ve sepsis hastalarında deksmedetomidin ve propofolün immün sistem üzerine etkileri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anestezi ve Reanimasyon Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Adana.
- Kayal S, Jais JP, Aguiñi N, Chaudiere J, Labrousse J (1998). Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with acute infection. *Am J Respir Crit Care Med*, 157(3), 776-784.
- Kozat S, Tuncay I (2018). Prevalance of Rotavirus, Coronavirus, *Cryptosporidium* spp., *Escherichia coli* K 99, and *Giardia lamblia* pathogens in neonatal calves with diarrheic in Siirt Region. *Van Vet J*, 29 (1), 17-22.
- Kozat S (2018). Hypothermia in newborn calves. *Ist Vet Sci*, 2(1), 30-37.
- Kozat S, Ozkan C (2018). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and C-Reactive Protein (CRP) levels in calves naturally infected with *Mycoplasma bovis*. *Int J Vet and Animal Res*, 1(2), 34-37.
- Lee WC, Hsiao HC, Wu YL, Lin JH, Lee YP, Fung HP, Chu RM (2003). Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can J Vet Res*, 67(2), 102.
- Lofstedt J, Dohoo IR, Duizer G (1999). Model to predict septicemia in diarrheic calves. *J Vet Intern Med*, 13(2), 81-88.
- MacKay RJ, Merritt AM, Zertuche JM, Whittington M, Skelley LA (1991). Tumor necrosis factor activity in the circulation of horses given endotoxin. *Am J Vet Res*, 52(4), 533-538.
- MacKay CR, Imhof BA (1993). Cell adhesion in the immune system. *Immunol Today*, 14(3), 99-102.
- Martin H, Olander B, Norman M (2001). Reactive hyperemia and interleukin 6, interleukin 8, and tumor necrosis factor- α in the diagnosis of early-onset neonatal sepsis. *Pediatrics*, 108(4), 61-6.
- Mehr SS, Doyle LW, Rice GE, Vervaaert P, Henschke P (2001). Interleukin-6 and interleukin-8 in newborn bacterial infection. *Am J Perinatol*, 18(06), 313-324.
- Michaels FH, Banks KL (1988). Contribution of various host factors to resistance to experimentally induced bacterial endotoxemia in calves. *Am J Vet Res*, 49(4), 557-562.
- Molina EC (2005). Serum interferon-gamma and interleukins-6 and-8 during infection with *Fasciola gigantica* in cattle and buffaloes. *Am J Vet Res*, 6(2), 135-139.
- Morris DD, Crowe N, Moore JN (1990). Correlation of clinical and laboratory data with serum tumor necrosis factor activity in horses with experimentally induced endotoxemia. *Am J Vet Res*, 51(12): 1935-1940.
- Morris DD, Moore JN, Crowe N, Moldawer LL (1992). Effect of experimentally induced endotoxemia on serum interleukin-6 activity in horses. *Am J Vet Res*, 53(5), 753-756.
- Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW, Lin G (1996). Inflammatory cytokines in animal health and disease. *Vet Immunol Immunopathol*, 54(1-4), 45-55.
- Nakajima Y, Mikami O, Yoshioka M, Motoi Y, Ito T, Ishikawa Y, Yasukawa K (1997). Elevated levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) activities in the sera and milk of cows with naturally occurring coliform mastitis. *Res Vet Sci*, 62(3), 297-298.
- Natanson G, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Parrillo JE (1989). Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med*, 169(3), 823-832.

- Okusawa S, Gelfand JA, Ikejima T, Connolly RJ, Dinarello C (1988).** Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J Clin Invest*, 81(4), 1162.
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH (2004).** Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*, 35(2), 163-187.
- Pohlman TH, Stanness KA, Beatty PG, Ochs HD, Harlan JM (1986).** An endothelial cell surface factor (s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol*, 136(12), 4548-4553.
- Rothstein JL, Schreiber H (1988).** Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85(2), 607-11.
- Sessler CN, Windsor AC, Schwartz M, Watson L, Fisher BJ, Sugerman HJ, Fowler AA (1995).** Circulating ICAM-1 is increased in septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, 151(5), 1420-1427.
- Steel DM, Whitehead AS (1994).** The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today*, 15, 2, 81-88.
- Terekci MH, Şahan B, Top C (2008).** Hücre adezyon molekülleri. *Nobel Medicus*, 4(1), 4-10.
- Waage S, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P, Espevik T (1989).** The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exper Med*, 169(1), 333-338.
- Wakabayashi G, Gelfand JA, Jung WK, Connolly RJ, Burke JF, Dinarello CA (1991).** *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. *J Clin Invest*, 87(6), 1925.
- Weinberg JR, Wright DJM, Guz A (1988).** Interleukin-1 and tumour necrosis factor cause hypotension in the conscious rabbit. *Clin Sci*, 75(3), 251-255.
- Whalen MJ, Doughty LA, Carlos TM, Wisniewski SR, Kochanek PM, Carcillo JA (2000).** Intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 are increased in the plasma of children with sepsis-induced multiple organ failure. *Crit Care Med*, 28(7), 2600-2607.





Anesthetic Activity of Clove Oil (Eugenol) on the Lake Van Fish (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811)

Ali ŞAHİN¹ Ertuğrul KANKAYA² Orhan YILMAZ³ İdris TÜREL⁴ Ahmet Cihat ÖNER³

¹ Karamanoğlu Mehmetbey University, Faculty of Health Sciences, Departments of Nursing, Karaman, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Fisheries Department of Fisheries Basic Sciences, Van, Turkey

³ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary, Department of Preclinical Sciences, Department of Pharmacology And Toxicology, Van, Turkey

⁴ Bolu Abant İzzet Baysal University, Faculty of Medicine, Internal Medicine Sciences, Department of Medical Pharmacology, Bolu, Turkey

Received: 15.01.2016

Accepted: 11.10.2019

ABSTRACT

The use of clove oil (eugenol) as an anesthetic for Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichi*), an endemic cyprinid fish species of Lake Van basin, was examined. Induction times were determined to be ≥ 35 , < 4 , < 3 , < 2 , < 2 and ≥ 1 min at 20, 40, 50, 60, 80 and 100 mg/L clove oil concentrations, respectively. Recovery times upon 10 min of exposure to eugenol were determined respectively to be > 3 , > 4 , > 3 , > 4 , > 6 and > 8 min clove oil can be considered as a suitable anesthetic for *Chalcalburnus tarichi* and an optimum anesthetic concentration of 50 mg/L is recommended.

Keywords: Anesthesia, *Chalcalburnus tarichi*, Eugenol

öz

Van Gölü İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi* Pallas, 1811) Balığında Karanfil Yağının (Öjenol) Anestezik Etkisi

Karanfil yağının Van Gölü Havzası endemik balığı olan inci kefalinde anestezik olarak kullanılması incelenmiştir. 20, 40, 50, 60, 80, 100 mg/L konsantrasyonlarında indüksiyon zamanları sırası ile ≥ 35 , < 4 , < 3 , < 2 , ≥ 1 dk olarak tespit edilmiştir. Balıkların öjenole 10 dakika maruziyetten sonra uyanma süreleri sırası ile > 3 , > 4 , > 3 , > 4 , > 6 , > 8 dk olarak belirlenmiştir. Öjenol *Chalcalburnus tarichi*'de de uygun bir anestezik olarak kabul edilebilir ve optimum anestezik konsantrasyon 50 mg/L olarak önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Anestezi, *Chalcalburnus tarichi*, Öjenol

INTRODUCTION

Anesthetics play important roles in fishery research and culture as they are used in weighing, height measurement, intake of eggs and sperm, marking and prevention of animal stress in various veterinary practices, which are all carried out manually (Çetinkaya and Şahin 2005; Hajek et al. 2006). During those manual practices, such common fish anesthetics astringine (MS222), quinaldine sulfate, benzocaine and phenoxy ethanol are commonly used. However, anesthetics may cause certain side effects, including gill irritation, corneal damage and general poisoning in fish. Therefore, clove oil can be used as an alternative anesthetic because of its economic benefits and nontoxic characteristics. Being a natural product with active component of eugenol, clove oil is thus recommended as an effective and inexpensive fish anesthetic (Inoue et al. 2003; Hajek et al. 2006). This fish species lives in Lake Van basin and is of considerable local economic importance. It is consumed as fresh and salted by the people living around the Lake Van basin (Duyar 2000).

The aim of this study was to investigate the anesthetic activity of clove oil on the Lake Van fish (*Chalcalburnus tarichi*).

MATERIALS and METHODS

Chalcalburnus tarichi were caught with throw-net from their habitat of Karasu stream that flows into the Lake Van and brought to the test field in aerated containers. The fish with 8.7 ± 1.25 cm were used in the experiments. Upon placing in a fiberglass tank of 800 L filled with dechlorinated tap water with ventilation the fish were fed with commercial trout pellets for 7 days of acclimation. During the acclimation period and experiments, water temperature was maintained at 20.4 ± 0.35 °C, pH at 8.39 ± 0.17 , dissolved oxygen at 6.7 ± 0.8 , dissolved oxygen saturation at $79\% \pm 10$, electrical conductivity at 839.9 ± 10.37 µS/cm, total hardness as CaCO₃ at 328 ± 14 mg/L, and total alkalinity as CaCO₃ at 514 ± 8 mg/L (Anonymous 1995).

The experiments were carried out in a glass aquarium containing 60 L of water. Ten fish for each group were exposed to eugenol for 10 min eugenol was diluted 1:10 in 95% ethanol because of its water insolubility and a 100 mg of stock working solution for anesthesia experiments was prepared. The duplicate experiments were performed in 7 groups at eugenol concentrations of 20, 40, 50, 60, 80 and 100 mg/L (Inoue et al. 2003; Hajek et al. 2006) and 1:10 diluted 95% ethanol solution (Ünsal 1998; OECD 2000; EPA 2002a; EPA 2002b; Çetinkaya 2005).

Data were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) using SPSS 11.5 for Windows. Different means were compared using Duncan's multiple-range post hoc test. The results were expressed as the mean \pm standard error of the mean and the differences were considered statistically significant at $p < 0.01$. Research Approval Certificate for the study was granted by the Local Ethic Committee of Animal Experiments at Van Yuzuncu Yil University (Decision Number: 2011/01/09).

Table 1. Anesthesia induction times on *Chalcalburnus tarichi* (n=10)

Clove oil (mg/L)	Induction time (seconds) ¹	Wake-up time (seconds)
20	2100.0 \pm 94.3 ^d	202.0 \pm 77.6 ^a
40	224.4 \pm 81.1 ^c	268.0 \pm 43.1 ^a
50	174.2 \pm 74.3 ^{bc}	230.0 \pm 44.5 ^a
60	104.2 \pm 12.9 ^{ab}	283.0 \pm 44.5 ^a
80	103.6 \pm 20.8 ^{ab}	378.0 \pm 76.5 ^a
100	65.0 \pm 14.8 ^a	514.0 \pm 60.7 ^a
Control	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0

Values are expressed means \pm standard error. Same letters in the same column indicate similar values ($p < 0.01$).

DISCUSSION

Inoue et al. (2003) reported that the clove oil anesthetic effect at 40 mg/L on *Bryconcephalus* juveniles taken place in 1 min and that the wake up from anesthesia occurred independent of the concentration. Hajek et al. (2006) studied anesthetic effects of clove oil on *Cyprinus carpio* and reported that 30-50 mg/L concentration was safe and very effective. In a study aiming at the determination of acute toxicity and anesthetic effects of clove oil on *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions, Soltani et al. (2004) reported that when clove oil concentration was increased, the time required for sedation and anesthesia was shorter. The results of this study were in agreement with the results of other researchers and proved that eugenol in various concentrations can be used as an anesthetic agent on *C. tarichi*. Although the results shown in Table 1 focused on 50 and 60 mg/L concentrations, as the amount of given anesthesia increases on *C. tarichi*, the wakeup time is surprisingly delayed with lengthened time for entering induction. As seen in Table 1, clove oil concentration about 50 mg/L was enough to anesthetize the fish in <3 minute and the wake up time was independent in regard to anesthetic concentration. Therefore, optimum anesthetic concentration is 50 mg/L for *C. tarichi*.

CONCLUSION

As a result, eugenol, the extract of clove oil used commonly in dentistry for many years, appears to be an alternative anesthesia in fisheries. This study proves that eugenol is an acceptable anesthetic for *C. tarichi*.

RESULTS

Table 1 includes the induction and wake up times of *C. tarichi* subjected to various eugenol concentrations.

Induction times were determined to be ≥ 35 , <4, <3, <2, <2 and ≥ 1 min at 20, 40, 50, 60, 80 and 100 mg/L clove oil concentrations, respectively. Recovery times upon 10 min of exposure to eugenol were determined respectively to be >3, >4, >3, >4, >6 and >8min.

There were significant differences between the groups ($p < 0.01$). The longest induction time was attained at 20 mg/L eugenol concentration. There were no statistically significant difference in induction times at 60, 80, 100 mg/L concentrations. These three concentrations also get into the same period of time in induction. The anesthetic effect was not observed in the control group.

REFERENCES

- Anonymous (1995).** Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Edition, APHA, AWWA, WEF, Washington, USA.
- Çetinkaya O (2005).** Aquatic toxicology, fish bioassays, Part 7, In: Fish Biology Research Methods, Karatas M (Ed), 512, Nobel Publication No. 772, Series of Publications in Science and Biology No. 1, Ankara.
- Çetinkaya O, Şahin A (2005).** Anesthesia practices in fish and the major anesthetics, Part 9, In: Fish Biology Research Methods, Karatas M (Ed), 512, Nobel Publication No. 772, Series of Publications in Science and Biology No. 1, Ankara.
- Duyar HA (2000).** An investigation on the chemical composition of muscle, eggs and processing of the flesh as croquet in İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas1811). PhD Thesis. Ege University, Institute of Science, Izmir, Turkey.
- Hajek GJ, Klyszejko B, Dziaman R (2006).** The anaesthetic effect of clove oil on Common carp, *Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyologica et Piscatoria, 36 (2), 93-97.
- Inoue LAKA, Neto CS, Moraes G (2003).** Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxá *Bryconcephalus* (Gunther, 1869). Ciencia Rural, Santa Maria, 33(5), 943-947.
- OECD (2000).** Test No. 215: Fish, Juvenile Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris.
- Soltani M, Marmari GH, Mehrabi MR (2004).** Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. Aquacult Int, 12, 457-466.
- EPA (2002a).** Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to fresh water organisms. Fourth Edition, EPA-821-R-02-013. U.S. EPA Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460.
- EPA (2002b).** Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to fresh water and marine organisms. Fifth Edition, EPA-821-R-02-012. U.S. EPA Office of Water (4303T) 1200 Pennsylvania Avenue, NW Washington, DC 20460.
- Ünsal M (1998).** Pollution experiments: Evaluation of methods and result. TKB, Fisheries Research Institute, Bodrum, Turkey.



Estimate by Quantitative Methods of the Effect on Some Milk Yield Traits with CMT Score of Subclinic Mastitis in Cows: Pilot Study

Pınar AYVAZOĞLU DEMİR¹ Funda EŞKİ²

¹ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of livestock Economics and Management, Kars, Turkey

² Cukurova University, Faculty of Ceyhan Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, Adana, Turkey

Received: 02.08.2019

Accepted: 03.10.2019

ABSTRACT

The material of this study consisted of 400 mammary lobe belonging to 100 cows from different breeds (Holstein and Holstein Crossbred) aged between 2-8 years in family dairy cattle enterprises in Ceyhan district of Adana province. In this study, the relationship between cows breed, age, number of lactation, lactation periods, daily average milk yield and CMT score were examined. No significant difference was found between CMT positivity rates in Holstein (49.6%) and Holstein Crossbred (46.4%) cows. As the age (≤ 4 and $5 \geq$) and the number of lactations increased (2 and ≤ 3), there was a corresponding increase in CMT positive percentage and CMT score was found to be higher in the late lactation period (7-9 months). No statistically significant difference was found between the udder quarters and CMT positivity rates of the cows. In the study, it was determined that the daily milk yield of the cows was 18 kg and it was found that the milk yield loss showed significant differences according to the CMT test scores of the cows. The mean loss of milk yield in cows with CMT (+) was 3.37 kg, 5.35 kg in CMT (++) and 6.87 kg in CMT (+++). In the analysis, the correlation between CMT test score and milk yield was linear and inverse ($P < 0.001$); it was estimated that milk yield loss caused by 1 unit increase in CMT was 1.92 kg/cow/day.

Keywords: Subclinical mastitis, CMT, Milk yield loss, Quantitative Method, Cow

ÖZ

İneklerde Subklinik Mastitisin CMT Skoru ile Süt Verimine Etkisinin Kantitatif Metotlarla Tahmini: Pilot Çalışma

Bu çalışmanın materyalini Adana ili Ceyhan ilçesinde aile süt sığırcılık işletmelerinde, yaşları 2-8 arasında değişen farklı ırklardan (Holştayn ve Holştayn Melezi) toplam 100 ineğe ait 400 meme lobu oluşturdu. Çalışmada ineklerin ırkı, yaşı, laktasyon sayısı, laktasyon dönemleri, günlük ortalama süt verimi ile CMT skoru arasındaki ilişkiler incelendi. Holştayn (%49.6) ve Melez (%46.4) ırkı ineklerde CMT pozitiflik oranları arasında fark bulunmadı. Yaş (≤ 4 ve $5 \geq$) ve laktasyon sayısı arttıkça (2 ve ≤ 3) CMT pozitifliğin görülme oranının arttığı, laktasyonun 7-9. aylarında CMT skorunun daha yüksek olduğu tespit edildi. Çalışmada ineklerin meme loplari ile CMT pozitiflik oranları arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. Çalışmada ineklerin günlük süt veriminin ortalama 18 kg olduğu belirlenmiş olup, süt verim kaybının ineklerin CMT test skorlarına göre önemli ölçüde farklılıklar gösterdiği tespit edildi. CMT (+) olan ineklerde süt verim kaybının ortalama 3.7 kg, CMT (++) olanlarda 5.35 kg, CMT (+++) olanlarda 6.87 kg olarak tespit edildi. Yapılan analizde, CMT test skoru ile süt verimi ilişkisinin doğrusal ve ters yönlü bir ilişki olduğu ($p < 0.001$) ve CMT' de meydana gelen l ünite artışın neden olduğu süt verim kaybının 1.92 kg/inek/gün olduğu tahmin edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Subklinik mastitis, CMT, Süt verim kaybı, Kantitatif metot, İnek

GİRİŞ

Subklinik mastitis; süt veriminin azalması, süt kalitesinin düşmesi, tedavi süresince sütün atılması, tedavi ve veteriner hekim giderleri üzerindeki olumsuz etkilerinden dolayı özellikle süt sığırcılık işletmelerinin en önemli ekonomik kaybını oluşturur (De Graves ve Fetrow 1993). Hastalık klinik semptom göstermeden seyrettiği için

gözden kaçmakta ve kolaylıkla yayılabilmektedir (Baştan 2002). Sütte bulunan somatik hücreler (lökositler ve meme epitel hücreleri), meme sağlığının ortaya konmasında ve subklinik mastitislerin tanısında bir kriter olarak kullanılabilir (Dohoo ve Meek 1982). Subklinik mastitisin ortaya konulmasında kimyasal ve mikrobiyolojik testlerden yararlanılmaktadır (Soltaş 2016).

Hastalık, sütte somatik hücre ve bakteri sayısındaki artışa neden olduğundan dolayı olarak sütte somatik hücre sayısına (SHS) veya California Mastitis Testi (CMT) yapılarak hastalık ve düzeyi başarılı bir şekilde tespit edilmektedir (Erdem 2005). Normal bir sütte SHS genellikle ml'de 200.000'in altındadır. Ancak SHS sürü yönetimi iyi olan sürülerde veya ilk laktasyondaki hayvanlarda 100.000 adet/ml'nin altında olabilmektedir. Bu sayı, CMT (+) olanlarda 300.000-500.000, CMT (++) olanlarda 500.000 -1.000.000 ve CMT (+++) olanlarda ise 1.000.000'dan daha fazla olduğu bildirilmekle birlikte tam olarak standardize edilmemiştir (Rişvanlı ve Kalkan 2002). Fakat SHS'nin ml'de 250.000-300.000'in üzerinde olması genellikle süttün anormal olduğunun ve memenin bir enfeksiyona (mastitis) maruz kalarak süt veriminde ve kalitesinde düşmeye sebep olduğunun göstergesi olmaktadır (Querengässer ve ark. 2002).

Bu pilot çalışma, Adana ili Ceyhan ilçesindeki aile süt sığırcılığı işletmelerindeki subklinik mastitis oranını ve risk faktörlerini belirlemek, bu oranların ineklerin ırklarına, yaşlarına, laktasyon sayılarına, laktasyon dönemlerine, ortalama süt verimleri ile mastitis tanısında kullanılan CMT skoru arasındaki ilişkiyi ortaya koymak amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Materyal olarak Adana ili Ceyhan ilçesinde farklı süt sığırcılığı işletmelerinde bulunan, 2-8 yaşlı, farklı ırklarda (Holştayn ve Holştayn Melezi), klinik muayenede mastitis belirtisi göstermeyen 100 baş inek ve bunlara ait 400 meme lobu kullanıldı.

Çalışma için Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi Yerel Etik Kurulu tarafından etik kurulu izni alınmıştır (26.02.2018 tarih ve 1/3 no'lu karar).

Subklinik mastitis, CMT sonuçlarına göre enfeksiyonun varlığını ve şiddetini gösteren karışımın pıhtılaşma ve viskozitesinin doğasına (süt ve CMT reaktif) dayanarak teşhis edildi. Toplam 400 süt örneği California Mastitis Testi (CMT-Test, Cat No: 170365, Kruuse) ile incelendi.

Bu amaçla, uygun koşullarda özel CMT kabının 1 (sağ ön), 2 (sağ arka), 3 (sol ön) ve 4 (sol arka) gözlerine memelerden yaklaşık ikişer ml süt örneği alındı. Üzerine eşit miktarlarda CMT ayracı ilave edildi. Test skoru hiçbir değişiklik görülmeyen, hafif gri renkte ve sıvı olarak kalan karışım negatif (-) olarak, eşik değeri (+), (++) , (+++) olan örnekler ise pozitif kabul edildi.

Ayrıca hayvan sahiplerinden ilgili hayvanlara ilişkin günlük süt verimi, laktasyon sayısı ve laktasyon dönemine ait bilgiler alındı.

İstatistiksel analizler

Çalışmadan elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamalarında SPSS Statistics 22 paket programı kullanılarak ki kare (X^2) testi ve Regresyon analizi yapıldı. Çalışmada ineklerin; laktasyon sayısı, günlük ortalama süt verimi, yaşı ve laktasyon dönemleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda inekler;

Yaş = (yıl); 1. (≤ 4 yaş), 2. (5 yaş \leq).

İrk = 1. (Holştayn), 2. (Holştayn Melezi)

Günlük ortalama süt verimi (kg) = 1. (1-14 kg), 2. (15-20 kg), 3. (21 kg \leq).

Laktasyon sayısı; 1.(ilk 2 laktasyon), 2 .(3 laktasyon ve üstü)

Laktasyon dönemi (ay); 1. (1-3; Erken dönem), 2. (4-6; Orta dönem), 3. (7-9; Geç dönem)

CMT test skoru; 0. (negatif), 1. (CMT +), 2. (CMT ++), 3. (CMT +++) şeklinde alt gruplara ayrıldıktan sonra gerekli analizlere tabi tutulmuştur.

Süt verimi ile CMT arasındaki kantitatif ilişki çoklu regresyon analiziyle tahmin edilmiştir. Kullanılan model aşağıda verilmiştir.

$$SV_i = CMTSKOR_i + LAK_i + LAKDÖN_i + YAŞ_i + İRK_i$$

Denkleme:

SV_i i'inci ziyaret gününde süt verimi (kg/gün/inek)

$CMTSKOR_i$ i'inci ziyaret gününde her mililitre sütte bulunan CMT test sonucu

$LAKSAY_i$ i'inci ziyaret gününde ineğin laktasyon sayısı

$LAKDÖN_i$ i'inci ziyaret gününde laktasyon dönemi (erken, orta ve geç dönem)

$YAŞ_i$ i'inci ziyaret gününde ineğin yaşı

$İRK_i$ i'inci ziyaret gününde ineğin ırkı

BULGULAR

Meme loblarına göre CMT test skorunun dağılımı Tablo 1'de sunuldu. İneklerdeki CMT pozitiflik oranı sağ ön meme loblarında %19 sağ arka meme loblarında %28, sol ön meme loblarında %33, sol arka meme loblarında %24 olarak belirlenirken, ortalama CMT pozitiflik oranı %26 olarak tespit edildi. Meme lobları ile CMT sonuçları arasındaki ilişki Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2'de görüldüğü gibi ineklerdeki CMT pozitiflik oranı sağ meme loblarında %23.5, sol meme loblarında %28.5 olarak belirlenirken, sağ ve sol meme lobları arasında CMT pozitif oranı bakımından istatistiksel anlamda farklılık tespit edilmemiştir. Ön ve arka meme loblarındaki CMT pozitif oranı %26 olarak bulunmuştur. Ön ve arka meme lobları arasındaki karşılaştırmalarda da CMT pozitif oranı bakımından farklılık belirlenmemiştir. Çalışmada çeşitli faktörlere göre CMT sonuçları

Tablo 3'te sunuldu. İrk grupları bakımından CMT pozitiflik oranı Holştayn %48.6 ve Holştayn Melezi ineklerde %46.4 olup, yapılan ki kare analizinde elde edilen farkın istatistiksel olarak yüksek düzeyde önemli ($p > 0.05$) olmadığı belirlendi. Yaş gruplarında CMT pozitiflik oranı ≤ 4 yaş ineklerde %39.6, ≥ 5 yaş ineklerde % 57.4 olarak bulundu. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda elde edilen farkın istatistiksel olarak önemli ($p < 0.05$) olduğu belirlendi. Laktasyon sayılarına ait gruplar arasında CMT pozitiflik oranları ilk iki laktasyonda ineklerin %36.7, laktasyon sayısı 3 ve üstü olan ineklerde %58.9 olarak tespit edilmiş olup, yapılan analizde aradaki farkın istatistiksel olarak yüksek düzeyde önemli ($p < 0.01$) olduğu bulundu.

Laktasyon dönemine göre CMT pozitiflik değerleri sırasıyla, erken dönem için %12, orta dönem için %38.1 ve geç dönem için ise %87.9 olarak tespit edildi.

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda elde edilen farkın istatistiki olarak yüksek düzeyde önemli ($p<0.01$) olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3'te ayrıca süt verimi ile CMT test sonuçları karşılaştırıldı. İneklerin süt verimine göre CMT pozitiflik değerleri, günlük süt verimi 14 kg ve altında olan ineklerde %86.2 iken, 15-20 kg süt veren ineklerde %40.5 ve 21 kg ve üstü süt verimi olan ineklerde %23.5 olup aradaki fark istatistiki açıdan önemli ($p<0.01$) bulundu.

Elde edilen veriler doğrultusunda ineklerin günlük süt verimi (kg/gün) ile CMT pozitiflik oranları arasındaki ilişki Tablo 4'te sunuldu.

Tablo 4 incelendiğinde CMT test sonucunun pozitif olduğu örneklerde süt veriminin diğerlerine göre daha düşük olduğu görülmektedir. Nitekim süt verimi 14 kg ve altında olan ineklerin %65.5'ünde en az 2 meme lobunda CMT pozitif çıktığı belirlenmiştir. Süt sığırcılık işletmeleri ile yapılan görüşmelerde inek başına günlük süt verimi ortalama 18 kg olduğu ifade edilmiş olup, CMT pozitifliğine göre oluşan tahmini süt verimi kaybı (kg/gün) Tablo 5'te sunuldu.

CMT negatif çıkan ineklerde günlük süt verimi ortalama 18.16 kg iken, CMT (+) olanlarda 14.88 kg, CMT (++) olanlarda 12.90 kg, CMT (+++) olanlarda 11.38 kg olduğu görülmektedir. CMT pozitifliğine göre değişmekle birlikte

günlük süt verim kaybı ortalama 5.20 olarak tespit edildi. Süt verimi regresyon modeline ait katsayı tahmin sonuçları ve ilgili istatistik bilgileri Tablo 6'da sunuldu.

Süt verimi ile CMT test skoru, laktasyon sayısı, laktasyon dönemi ve ırk arasında negatif korelasyon, yaş ile arasında ise pozitif korelasyon olduğu tespit edildi. F istatistiğinin önemli bulunması ($p<0.001$) modelin bir bütün olarak anlamlı olduğunu, 0.548 olarak bulunan düzeltilmiş R^2 değeri ise modele dâhil edilen bağımsız değişkenlerin süt verimindeki varyasyonun %54.8'ini açıkladığını göstermektedir.

Denkleme dâhil edilen tüm bağımsız değişkenlerin süt verimi üzerindeki etkisi $P<0.01$ düzeyinde önemli bulundu. Diğer bir ifade ile CMT test skoru ile süt verimi üzerindeki negatif etkisinin laktasyon sayısı ve laktasyon döneminin artmasıyla daha da şiddetlendiğini ve subklinik mastitisin neden olduğu süt verim kaybını artırdığı belirlendi.

Tablo 6'da CMT test skoru ile süt verimi ilişkisinin doğrusal ve ters yönlü bir ilişkinin olduğu ($P<0.001$); CMT test skoru sonucuna göre meydana gelen 1 ünite artışın neden olduğu süt verim kaybının ise 1.92 kg/inek/gün olduğu tahmin edildi.

Tablo 1. İneklerde meme loblarına göre CMT test skorunun dağılımı

Table 1. Distribution of CMT test score according to udder quarters in cows

Özellikler	CMT (-)	CMT (+)	CMT (++)	CMT (+++)	Toplam
Sağ Ön Lobları	81	7	4	8	100
Sağ Arka lobları	72	14	7	7	100
Sol Ön Lobları	67	18	7	8	100
Sol Arka Lobları	76	10	10	4	100
Toplam	296	49	28	27	400
Yüzde Değeri	%74	%12.3	%7.0	%6.7	%100

Tablo 2. İneklerde meme lobları ile CMT sonuçları arasındaki ilişki

Table 2. Relationship between udder quarters and CMT results in cows

Özellikler	CMT Pozitif		CMT Negatif	
	n	(%)	n	(%)
Sağ Meme Lobları	47	%23.5	153	%76.5
Sol Meme Lobları	57	%28.5	143	%71.5
X ² = 1.299 p>0.05				
Ön Meme Lobları	52	%26.0	148	%74.0
Arka Meme Lobları	52	%26.0	148	%74.0
X ² = 0.000 p>0.05				

Tablo 3. CMT sonuçlarının çeşitli faktörlere göre değerleri**Table 3.** Values of CMT results according to various factors

Parametreler		CMT görülme oranı			Total
		CMT Negatif	CMT (+)	CMT (++,+++)	
Irk	Holştayn	37	21	14	72
		51.4%	29.2%	19.4%	100.0%
	Holştayn Melezi	15	4	9	28
		53.6%	14.3%	32.1%	100.0%
Toplam	52	25	23	100	
		52.0%	25.0%	23.0%	100.0%
X ² = 3.218 p>0.05 p=0.200					
Yaş	≤4	32	16	5	53
		60.4%	30.2%	9.4%	100.0%
	5≤	20	9	18	47
		42.6%	19.1%	38.3%	100.0%
Toplam	52	25	23	100	
		52.0%	25.0%	23.0%	100.0%
X ² = 11.759 p<0.01 p=0.003					
Laktasyon sayısı	İlk iki laktasyon	31	14	4	49
		63.3%	28.6%	8.1%	100.0%
	3 ve üstü laktasyon	21	11	19	51
		41.1%	21.6%	37.3%	100.0%
Toplam	52	25	23	100	
		52.0%	25.0%	23.0%	100.0%
X ² = 12.030 p<0.01 p=0.002					
Laktasyon dönemi	erken dönem	22	3	0	25
		88.0%	12.0%	0.0%	100.0%
	orta dönem	26	7	9	42
		61.9%	16.7%	21.4%	100.0%
geç dönem	4	15	14	33	
	12.1%	45.5%	42.4%	100.0%	
Toplam	52	25	23	100	
		52.0%	25.0%	23.0%	100.0%
X ² = 36.703 p<0.01 p=0.000					
Süt verimi	14 kg ve altı	4	9	16	29
		13.8%	31.0%	55.2%	100.0%
	15-20 kg	22	11	4	37
		59.5%	29.7%	10.8%	100.0%
21-30 kg	26	5	3	34	
	76.5%	14.7%	8.8%	100.0%	
Toplam	52	25	23	100	
		52.0%	25.0%	23.0%	100.0%
X ² =33.059 p=0.000 p<0.01					

Tablo 4. Süt verimi ile meme lobu sayısına göre CMT pozitiflik görülme oranı**Table 4.** CMT positivity rate according to milk yield and number of udder quarters

Süt verimi	CMT pozitif					Toplam
	CMT negatif	1 lopta CMT pozitif	2 lopta CMT pozitif	3 lopta CMT pozitif	4 lopta CMT pozitif	
14 kg ve altı	4	6	7	6	6	29
	13.8%	20.7%	24.1%	20.7%	20.7%	100.0%
15-20 kg	20	12	3	1	1	37
	54.1%	32.4%	8.1%	2.7%	2.7%	100.0%
21-30 kg	26	2	4	0	2	34
	76.5%	5.9%	11.8%	0.0%	5.9%	100.0%
Toplam	50	20	14	7	9	100
	50.0%	20.0%	14.0%	7.0%	9.0%	100.0%

Tablo 5. Oluşan tahmini süt verimi kaybı (kg/gün)**Table 5.** Estimated loss of milk yield (kg/day)

CMT pozitiflik	Minimum	Maximum	Ortalama	Std. Sapma	Tahmini Süt verim Kaybı
CMT negatif	10.00	20.00	18.16	2.590	0.0
CMT (+)	12.00	20.00	14.88	2.717	-3.37
CMT (++)	9.00	20.00	12.90	2.144	-5.35
CMT (+++)	9.00	15.00	11.38	2.328	-6.87

Tablo 6. Tahmin edilen süt verimi regresyon tahmin sonuçları**Table 6.** Estimated milk yield regression estimation results

	B	SE	P
Sabit	21.237	1.357	<0.001
CMT test skoru	-1.925	0.302	<0.001
Laktasyon sayısı	-2.011	1.044	0.057
Laktasyon dönemi	-0.968	0.422	<0.05
İrk	-0.598	0.588	0.312
Yaş	0.479	0.408	0.243

R= 0.740 R²= 0.548 F Değeri: 22.787 (p<0.001). Durbin-Watson= 1.906

TARTIŞMA ve SONUÇ

Süt sığırcılığı işletmelerinin en önemli sorunlarından birisi mastitistir. Bu hastalık, süt veriminin ve kalitesinin azalması, mastitisli sütlerin atılması, ilaç ve veteriner hekim masrafları, hayvanların sürü dışına çıkarılması ve hayvanın piyasa değerinin düşmesi ile mastitiste koruma ve kontrol uygulamaları gibi nedenlerle her yıl milyonlarca dolarlık ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Seykora ve Mc Daniel 1985; Yalçın 2000). Nitekim mastitisten dolayı inek başına yıllık zarar ABD’de 182\$, İngiltere’de 80-208 £, İskoçya’da 69-208 £, Fransa’da 148-218 \$, Türkiye’de 244 TL olduğu bildirilmektedir (Jasper 1982; Sabuncuoğlu ve Çoban 2006; Yıldız ve Yalçın 2014). Mastitis genel olarak, klinik ve subklinik olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Klinik mastitisin ineğin memesinde kolaylıkla gözlenebilen dış belirtileri vardır. Ancak subklinik mastitis memenin klinik tablo göstermemesi nedeniyle fark edilmez ve uzun süre devam eder. Mastitise bağlı süt verim kayıplarının yaklaşık %70-80’i subklinik mastitisten kaynaklanmaktadır (De Graves ve Fetrow 1993; Yalçın ve ark. 2000). Mastitis oluşumunda, travmatik, bakteriyel, viral, paraziter ve kimyasal faktörler rol oynamaktadır. İrk, yaş, süt verim düzeyi laktasyon dönemi ve sayısı, anatomik sebepler, sağım şekli, mevsim ve iklim şartları, beslenme, ahır ve barınak şartları ile hayvanın metabolizma ve hormonal dengesi gibi etkenler hazırlayıcı faktörler olarak rol oynamaktadırlar (Contreras ve Rodríguez 2011). Bu çalışmada elde edilen verilerin aynı dönemde alınması ve işletmelerdeki ahır koşulları, meme hijyeni, sağım şekli gibi faktörlerin benzer olması nedeniyle çalışmada ırk, yaş, süt verimi, laktasyon dönemi ve sayısı dışındaki diğer faktörler dikkate alınmamıştır. Süt verimi yüksek olan ırklarda mastitis olgularına daha sık rastlandığı, süt veriminin artışına bağlı olarak mastitisin görülme oranının da arttığı bildirilmiştir (Şeker ve ark. 2000; Baştan 2013). Süt verimi yüksek olan ineklerde mastitis oranının daha fazla görülmesinin nedeni, memenin anatomik yapısı, memelerin yere yakın ve travmalara karşı daha hassas olması, fazla çalışan organların dış etkenlere karşı daha duyarlı hale gelmesinin olabileceği ifade edilmiştir (Alaçam ve ark. 1983). Çalışmalarda, Holştayn ırkı ineklerde Esmer ırkı ineklere oranla daha fazla subklinik

mastitise rastlanırken (Rişvanlı ve Kalkan 2002; Çoban ve Tüzemen 2007), tersine hastalığın Esmer ırkı ineklerde Holştayn ırkı ineklere göre daha fazla görüldüğü bildirilmiştir (Alaçam ve ark. 1983). Sabuncuoğlu ve ark. (2003) ise Hoştayn ve Esmer ırkı sığırlar arasında CMT skorlarına göre mastitise yatkınlık bakımından fark olmadığını, Busato ve ark. (2000) da, Simental, Simental × Kırmızı Holştayn melezi ve İsviçre Esmeri ineklerde subklinik mastitis oranı diğer ırklardan daha düşük olduğunu, yapılan birçok çalışmada ise ırklar arasında SHS, CMT ve prevalans bakımından farklılıklar belirlenmediği bildirilmiştir (Saydan ve Kalkan 2017). Bu çalışmada, Holştayn (%49.6) ve Holştayn Melezi (%46.4) ineklerde CMT pozitiflik oranları arasında fark bulunmadı. Hayvanların yaşının ilerlemesiyle birçok hastalıkta olduğu gibi subklinik mastitisin de belirgin olarak arttığı bildirilmektedir (Şeker ve ark. 2000; Biffa ve ark. 2005; Rahman ve ark. 2009; Mekibib ve ark. 2010; Saydan ve Kalkan 2017). Yapılan çalışma sonuçlarına göre ineklerin yaş ve laktasyon sayılarının artışı ile subklinik ve klinik mastitislerin görülme oranının arttığı (İzgür 1984; Roy ve ark. 1993; Şeker ve ark. 2000; Rişvanlı ve Kalkan 2002), bazı araştırmacılar mastitis ile ineğin yaş ve laktasyon sayısı arasında bir ilişkinin bulunmadığını (Sabuncuoğlu ve ark. 2003; Saydan ve Kalkan 2017), hatta genç hayvanların yaşlılara nispeten mastitise karşı daha duyarlı oldukları, ilk laktasyonunda olan veya hiç doğum yapmamış düvelerde bile mastitisin yüksek oranlarda gözlenebileceğini bildirilmiştir (Waage ve ark. 1998). Araştırmada yaş (≤4 ve ≥5) ve laktasyon sayısına göre (2 ve ≤3) CMT pozitiflik oranları arasında istatistiki açıdan önemli farklılık olduğu belirlenmiş olup, ineklerin yaşı ve laktasyon sayısı arttıkça CMT pozitiflik oranının da arttığı saptanmıştır. Laktasyon dönemine göre CMT pozitiflik değerleri sırasıyla, erken dönemde (1-3 ay) %12, orta dönemde (4-6 ay) %38.1 ve geç dönemde (7-9 ay) ise %87.9 olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda elde edilen farkın istatistiki olarak yüksek düzeyde önemli (p<0.01) olduğu belirlenmiştir. Hayvanların laktasyon dönemleri ile CMT pozitiflik oranı arasındaki ilişkinin ele alındığı çalışmalardan elde edilen sonuçlar çok farklılık göstermektedir (Şeker ve ark. 2000). Busato ve ark. (2000), laktasyonun 7-100 günlük

döneminde %21.2. 101-305 gün boyunca %34.5 olarak bulunmuşlardır. Biffa ve ark. (2005) ise çalışmalarında mastitis prevalansını laktasyon başlarında (%45.8) daha yüksek, ortalarında (%25.8) daha düşük bulunmuşlardır. Saydan ve Kalkan (2017), laktasyonun 0-2 aylık döneminde CMT pozitiflik oranını daha düşük olduğunu, Sabuncuoğlu ve ark. (2003) ise laktasyonun erken dönemlerinde CMT pozitiflik oranını daha fazla olarak belirlemişlerdir. Laktasyon dönemi ilerledikçe CMT pozitiflik oranının arttığı ancak 7-9. aydan sonra düştüğü bildirilmiştir (Şeker ve ark. 2000). Çoban ve ark. (2007) ise, laktasyonun 4. ayına kadar arttığını, 4. aydan 6. aya kadar azaldığını, 6-8. aylar arasında aynı seviyede seyrettiğini ve 8. aydan sonra tekrar artış göstererek 9. ayda en yüksek seviyeye ulaştığını belirlerken, bazı çalışmalarda ise laktasyonun ilerleyen dönemlerinde artışın olmadığı ifade edilmiştir (Emre 2009; Özdemir ve Kaymaz 2013). Bu çalışmada, laktasyonun ilerleyen dönemlerine paralel olarak CMT pozitiflik oranları da istatistiksel olarak daha yüksek bulundu. Subklinik mastitis ve ilgili meme loplari arasında farklılık olup olmadığı yönünden yapılan bir çalışmada (Busato ve ark. 2000), mastitis oranı ön meme loplariında diğerlerinden daha düşük bulunmuştur. Arka ve ön meme lobu açısından meme başının meme lokalizasyonu da subklinik mastitisin önemli bir faktörü olarak tanımlanmıştır. Şeker ve ark. (2000), Çetin ve Alan (2008), Sabuncuoğlu ve ark. (2003), Saydan ve Kalkan (2017) yaptıkları çalışmalarda, meme loblari arasında önemli bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmada da hayvanların CMT pozitifliği bakımından meme loplari arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. Bu sonuçlar Türkiye'de yapılan birçok araştırmacıların sonuçlarıyla benzer bulunmuştur (Şeker ve ark. 2000; Sabuncuoğlu ve ark. 2003; Çetin ve Alan 2008; Saydan ve Kalkan 2017). Elde edilen bu sonuç, birçok araştırma sonuçları ile benzer olsa da, alınan süt örneklerinde subklinik mastitis oranının meme loplariında %26 olmakla birlikte herhangi bir lobunda subklinik mastitis olan inek oranının %50 çıkması hastalığın yaygınlığının ne denli önemli olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan hayvanların çoğunluğunun aile işletmelerinde yer alan sığırların olması ve işletmelerde geleneksel yöntemlerle yetiştiricilik modelinin uygulanıyor olması subklinik mastitis oranlarının yüksek çıkmasında etkili olduğu düşünülmektedir. Meme loplari arasında CMT pozitiflik etkisinin daha iyi belirlenebilmesi için aynı çevre koşullarında yetiştirilen ırk, yaş, laktasyon sayısı, laktasyon dönemi standardize edilmiş büyük sürülerde daha fazla örnek ile çalışılması yararlı olabilir. Sonuç olarak, bu çalışmada ineklerin süt verimi ile CMT pozitiflik değerleri arasındaki fark istatistiki açıdan önemli bulunmuş, bu veri doğrultusunda mastitisin süt verimini düşürmede önemli etkisi olduğu söylenebilir. Nitekim ineklerin günlük süt veriminin ortalama 18 kg olduğu belirlenmiş olup, süt verim kaybının ineklerin CMT test skorlarına göre önemli ölçüde farklılıklar gösterdiği tespit edildi. Yapılan analizde, CMT test skoru ile süt verimi ilişkisinin doğrusal ve ters yönlü bir ilişki olduğu ve CMT'de meydana gelen 1 ünite artışın neden olduğu süt verim kaybının 1.92 kg/inek/gün olduğu tahmin edilmiştir.

KAYNAKLAR

- Alaçam E, Alpan O, Tekeli T (1983).** Süt ineklerinde Bazı Meme Ölçümleri ve Süt Verimi ile Subklinik Mastitis Arasındaki İlişkiler. Lalahan Hay Araşt Enst Derg, 22, 3-4.
- Baştan A (2002).** İneklerde meme hastalıkları. 1. Baskı. Hatiboğlu Yayınevi. Ankara.

- Baştan A (2013).** İneklerde meme sağlığı ve sorunları. 2. Baskı. Kardelen Ofset Matbaacılık. Ankara.
- Biffa D, Debela E, Beyene F (2005).** Prevalence and risk factors of mastitis in lactating dairy cows in southern Ethiopia. Int J Appl Res Vet M, 3, 189-198.
- Busato A, Trachsel P, Schallibaum M, Blum JW (2000).** Udder health and risk factors for subclinical mastitis in organic dairy farms in Switzerland. Pre Vet Med, 44, 205-220.
- Contreras GA, Rodríguez JM (2011).** Mastitis: Comparative etiology and epidemiology. J Mammary Gland Biol, 16 (4), 339-356.
- Çetin M, Alan M (2008).** Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Kliniğinde Karşılaşılan meme sorunları. YU Vet Fak Derg, 2, 1-6.
- Çoban Ö, Tüzemen N (2007).** Siyah Alaca ve Esmer İneklerde Subklinik Mastitis İçin Risk Faktörleri. Uludağ Univ J Fac Vet Med, 26(1-2), 27-31.
- Çoban Ö, Sabuncuoğlu N, Tüzemen N (2007).** Siyah alaca ve esmer ineklerde somatik hücre sayısına çeşitli faktörlerin etkisi. Lalahan Hay Araşt Enst Derg, 47, 15-20.
- De Graves FJ, Fetrow J (1993).** Economics of Mastitis Control. Vet Clin North Am Food Animal Practice, 9, 421-434.
- Dohoo IR, Meek AH (1982).** Somatic cell counts in Bovine Milk. Can Vet J, 23, 119-125.
- Erdem H (2005).** Sağlık ve sağım hijyeni. AB sürecinde kaliteli süt üretimi ve somatik hücre sayısı. Güzeliş Ofset Matbaa. 36-56. Konya.
- Emre B (2009).** İneklerde Meme Baş Derisi İle Deliginde Şekillenen Lezyonların Dağılımı ve Sütün Somatik Hücre Sayısına Etkileri. Doktora Tezi. Ankara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara.
- İzğür H (1984).** Mastitiste Predispoze Faktörler. 1. Mastitis semineri. 15-16 Kasım. Ankara.
- Jasper DE (1982).** Environmental mastitis. Vet Rec, 111(11), 226-236.
- Mekibib B, Furgasa M, Abunna F, Megersa B, Regassa A (2010).** Bovine mastitis: Prevalence, risk factors and major pathogens in dairy farms of Holeta town, central Ethiopia. Vet World, 3, 397-403.
- Özdemir S, Kaymaz M (2013).** Küçük aile işletmelerinde yetiştirilen ineklerde subklinik mastitis insidensi ve tanı yöntemlerinin karşılaştırılması. Ankara Univ Vet Fak Derg, 8, 71-79.
- Querengässer J, Geishauser T, Querengässer K, Fehlings K, Bruckmaier R (2002).** Investigations of milk quality from teats with milk flow disorders. J Dairy Sci, 10, 2582-2588.
- Rahman MA, Bhuiyan MMU, Kamal MM, Shamsuddin M (2009).** Prevalence and risk factors of mastitis in dairy cows. Bangl Vet, 26, 54-60.
- Rişvanlı A, Kalkan C (2002).** Sütçü ineklerde yaş ve ırkın subklinik mastitisli memelerin sütlerindeki somatik hücre sayıları ile mikrobiyolojik izolasyon oranlarına etkisi. YU Vet Fak Derg, 13(1-2), 84-87.
- Roy SK, Pyne AK, Maitra DN (1993).** Studies on Teat Size and Lactation Number in Relation to Incidence of Subclinical Mastitis in Some Herds of Crossbred Cows. Indian Veterinary J, 70, 677-678.
- Sabuncuoğlu N, Çoban Ö (2006).** Mastitis ekonomisi. Ankara Üniv Vet Fak Derg, 1(1-2), 1-5.
- Sabuncuoğlu N, Çolak A, Akbulut Ö, Tüzemen N, Bayram B (2003).** Siyah-Alaca ve Esmer ineklerde CMT skoru ile bazı süt verim özellikleri arasındaki ilişkiler. Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg, 34(2), 139-143.
- Saydan M, Kalkan C (2017).** Malatya Arguvan Yöresinde Süt İneklerinde Subklinik Mastitis Prevalansı. FÜ Sağ Bil Vet Derg, 31(3), 193-200.
- Seykora AJ, McDaniel BT (1985).** Udder and teat morphology related to mastitis resistance; a review. J Dairy Sci, 68(8), 2087-2093.
- Soltaş S (2016).** Klinik ve subklinik mastitisli keçi sütlerinden bazı aerobik bakteri ve mycoplasma spp. izolasyonu. Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı (Veteriner Programı). Yüksek Lisans Tezi. Van.
- Şeker İ, Rişvanlı A, Kul S, Bayraktar M, Kaygusuzoğlu E (2000).** İsviçre esmeri ineklerde meme özellikleri ve süt verimi ile CMT skoru arasındaki ilişkiler. Lalahan Hay Araşt Enst Derg, 40(1), 29-38.
- Waage S, Sviland S, Odegard SA (1998).** Identification of Risk Factors for Clinical Mastitis in Dairy Heifers. J of Dairy Sci, 81(5), 1275-1284.
- Yalçın C, Cevger Y, Türkyılmaz K, Uysal G (2000).** Süt ineklerinde mastitisten kaynaklanan süt verim kayıplarının tahmini. Turk J Vet Anim Sci, 24, 599-604.
- Yalçın C (2000).** Düşük ve yüksek subklinik mastitis problemiyle karşı karşıya olan İskoçya süt sığırcılık işletmelerinde mastitisten kaynaklanan finansal kayıplar. Turk J Vet Anim Sci, 24, 465-472.
- Yıldız AŞ, Yalçın C (2014).** Economic losses due to clinical mastitis in dairy herds in Ankara. Dicle Üniv Vet Fak Derg, 2(2), 55-62.



PCR detection of *Anaplasma phagocytophilum* in stray dogs in Batman, Turkey

Bekir OĞUZ Serdar DEĞER

Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Van, Turkey

Received: 18.09.2019

Accepted: 16.10.2019

ABSTRACT

Anaplasma phagocytophilum causes high-grade fever in humans, ruminants, horses, cats, and dogs. *Anaplasma phagocytophilum*, which causes granulocytic anaplasmosis in dogs, has a wide geographical distribution in the world, but there are not many studies on the *Anaplasma* species in dogs in Turkey. *Anaplasma phagocytophilum*, which infects leukocytes in dog, might also be zoonotic. This study aimed to investigate the *A. phagocytophilum* prevalence in stray dogs in Batman province of Turkey using Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Blood samples were drawn into EDTA tubes from the venae cephalica antebrachii of randomly selected 97 asymptomatic dogs in total. Identification of *A. phagocytophilum* was carried out using the conventional PCR method that was conducted by using the DNAs obtained from the samples. *Anaplasma phagocytophilum* prevalence was found to be 3.1% in the examined blood samples. In conclusion, infection of dogs in Batman province with *A. phagocytophilum* has been revealed molecularly for the first time with this study. It is considered that detection of this species, which can cause disease (Human granulocytic anaplasmosis) in humans as well, has contributed epidemiologically to the data on the spread of the disease throughout Turkey. Moreover, investigating the tick species that transmit the disease in the region where the study was conducted is important for developing effective control strategies against the disease.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*, Dog, Pathogen, PCR

ÖZ

Batman İli Sokak Köpeklerinde *Anaplasma phagocytophilum*'un PCR ile Belirlenmesi

Anaplasma phagocytophilum insan, ruminant, at, kedi ve köpeklerde şiddetli ateşli hastalıklara neden olmaktadır. Köpeklerde granülositik anaplasmosise neden olan *A. phagocytophilum* dünyada geniş bir coğrafik dağılım göstermektedir. Ancak Türkiye'de köpeklerde *Anaplasma* türleri üzerine çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, Batman ili sokak köpeklerinde *A. phagocytophilum* yaygınlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılması amacıyla yapılmıştır. Rastgele seçilen toplam 97 asemptomatik köpeğin vena cephalica antebrachii'lerinden EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmıştır. Alınan örneklerden elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılan konvensiyonel PCR yöntemi ile *A. phagocytophilum* identifikasyonu gerçekleştirilmiştir. İncelenen kan örneklerinde *A. phagocytophilum* prevalansı %3.1 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma ile Batman ili sokak köpeklerinin *A. phagocytophilum* ile enfeksiyonu moleküler olarak ilk kez ortaya konmuştur. İnsanlarda da hastalık oluşturan (Human granulocytic anaplasmosis) bu türün tespit edilmesinin, hastalığın Türkiye genelinde yayılışı konusundaki verilere epidemiyolojik anlamda katkı sağladığı düşünülmektedir. Ayrıca, çalışmanın yapıldığı bölgede enfeksiyonu nakleden kene türlerinin araştırılması hastalığa karşı etkili kontrol stratejilerinin geliştirilmesi bakımından önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Anaplasma phagocytophilum*, Köpek, Patojen, PCR

INTRODUCTION

Anaplasma phagocytophilum is an obligate intracellular bacterium which causes tick-borne zoonotic disease and can infect primarily neutrophils and also eosinophils (Carrade et al. 2009). This species, which causes granulocytic anaplasmosis in dogs, has been identified also in cats (Bjoërsdorff et al. 1990), horses (Passamonti et al.

2010), dogs (Bjoërsdorff et al. 1990, Jennifer et al. 2009), rodents (Liz et al. 2000, Christova and Gladnishka 2005), deer (Jenkins et al. 2001) and humans (Petrovec et al. 1997) besides domestic ruminants. It is considered that dogs, horses, and humans are accidental hosts. Granulocytic anaplasmosis in dogs was first reported in California in 1982 (Madewell and Gribble 1982), later its existence has been revealed at increasing rates year by

year (Carrade et al. 2009). The vector transmitting the disease is the tick species of *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) in Europe, *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) in Asia, and *Ixodes pacificus* (*I. pacificus*) and *Ixodes scapularis* (*I. scapularis*) in North America (Woldehiwet 2010). In the regions where the disease is endemic, any clinical findings were not observed in many of the dogs that were detected to be 60% seropositive. However, lethargy, inappetence, and fever are observed in the dogs infected with *A. phagocytophilum* (Beall et al. 2008; Eberts et al. 2011). Splenomegaly and lymphadenopathy have been reported in anaplasmosis and it was concluded that they were caused by lymphoid hyperplasia. In a great portion (90%) of anaplasmosis cases that are caused by *A. phagocytophilum*, thrombocytopenia develops depending on the destruction of thrombocytes (Eberts et al. 2011). Diagnosis of *A. phagocytophilum* infections in dogs is usually made by the serological methods such as immunofluorescence antibody technique (IFAT) and rapid diagnostic ELISA test. However, cross-reactivities may be observed in the dogs infected with *A. phagocytophilum* and *A. platys*. It has been reported that this creates a serious disadvantage in regions where both two species progress together (Carrade et al. 2009). In recent years, PCR method, which has a higher specificity and sensitivity than microscopic and serological diagnosis methods, has become a reason for preference in the diagnosis of anaplasmosis in dogs. By means of this technique, the infection can be detected even in the animals having very low parasitemia and thus reservoir animals can be determined (Massung and Slater 2003; Santos et al. 2011; Ebani et al. 2013; Vargas-Hernandez et al. 2016; Huber et al. 2017). In Turkey, the number of studies on the *Anaplasma* species in dogs is limited. Blood samples of 371 dogs in the Aegean Region were examined by nested PCR in terms of *A. platys* and *A. phagocytophilum*, and *A. platys* was detected in 146 dogs (39.4%), and *A. phagocytophilum* was detected in 193 (52%) of them (Karagenc et al. 2005). Moreover, a case related to *A. platys* was reported (Ulutas et al. 2007). However, the existence of *A. phagocytophilum* was shown both in possible vectors and in cattle, sheep, and wild mice using both serological and molecular methods (Aktas et al. 2010, 2011; Sen et al. 2011).

This study aimed to investigate the *A. phagocytophilum* prevalence in the peripheral whole blood samples of stray dogs in Batman province by using the PCR technique.

MATERIALS and METHODS

In the Veterinary Technical Health Center of the Municipality of Batman in various periods in 2018, blood samples were drawn into the EDTA tubes from the venae cephalica antebrachii of 97 asymptomatic dogs in total. The animals from which the blood samples were collected were the stray dogs that were brought to the Technical Health Center for sterilization or treatment. Animal ethics, method and sampling approval was obtained from the University of Van Yuzuncu Yil Animal Ethics Committee (approval number: 05/04/2019-27762). All samples were stored at -20°C until the laboratory studies were conducted. Genomic DNA was obtained from the blood

DISCUSSION

Currently, it is important to know the presence and spread of the tick-borne parasites in dogs, and to reveal their molecular epizootiologies for necessary treatment, control and protection measures. *Anaplasma phagocytophilum*, one of these blood parasites, is a zoonotic species which is

samples collected from the stray dogs by using commercial blood kit (GeneAll® Exgene™ Tissue SV (plus!), Korea). The obtained DNA samples were stored at -20°C until the PCR examinations were carried out. In analyzing the obtained DNA samples in terms of *A. phagocytophilum*, they were processed by KO97 numbered commercial PCR kit (Genekam Biotechnology, Germany) in compliance with the procedure that the producing company had reported. The amplification products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and were evaluated at the gel documentation system (Avegene, Taiwan).

RESULTS

In the examinations conducted using PCR method, 3 (3.1%) of the 97 asymptomatic dogs were found infected with *A. phagocytophilum*. The information on sex and gender of the examined animals were summarized in Table 1.

Table 1. Relation to age and gender of the canine study population

	Study population No. = 97	PCR positive dogs No. = 3.1 (%)
Gender		
Female	50	2
Male	47	1
Age (year)		
<1	14	0
1-2	50	2
>2	33	1

As a result of the amplification and the agarose gel electrophoresis of the DNA that was extracted from the blood samples in the PCR, positive bands of about 444 bp long were obtained (Figure 1).

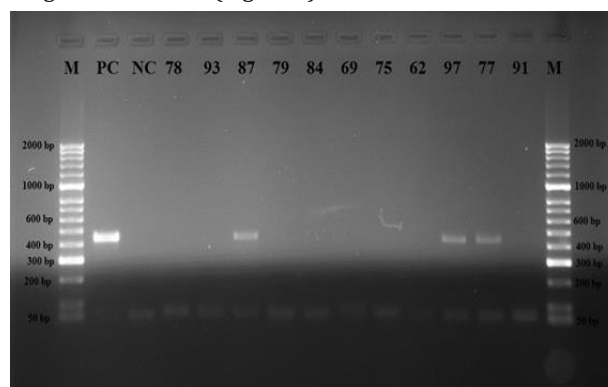


Figure 1. Appearance on agarose gel electrophoresis (1.5%) stained with ethidium bromide of *A. phagocytophilum* DNA extracted from the blood samples. M: 50 bp DNA ladder, 87, 97, 77: Positive samples, NC: Negative control, PC: *A. phagocytophilum* Positive control.

transtadially transmitted to humans, dogs, and other animals through ticks of family Ixodidae. Several methods were used in the diagnosis of this parasite in dogs. Although it is the oldest among these models, microscopic examination is still a reliable method (Sainz et al. 2015). This method facilitates diagnosis of the disease mostly in its acute periods. Besides, serological methods, which are

based on the detection of antibodies that develop against the parasite, are also used (Potkonjak et al. 2015). False positives due to the cross-reactivities that emerge during serological diagnosis (especially positives that develop against *A. platys* species) are tried to be removed by recombinant antigens. Molecular diagnostic methods that are based on the detection of the parasite DNA, which has been widely used in recent years, are also used in the diagnosis of the *Anaplasma* species, as in the diagnosis of several infectious factors. PCR is used as a sensitive and specific method for detecting the *Anaplasma* spp. DNA from the clinical samples taken from ticks and animals. Ebani et al. (2013) detected the parasite with the specific primers that they designed from *A. phagocytophilum* 16S rRNA gene by using Nested-PCR method. Besides, Santos et al. (2011) conducted the identification of *A. phagocytophilum* in dogs with Real-Time PCR using different gene region and primers. The same researchers revealed partial sequences of the isolates they detected according to msp2 gene region. Melter et al. (2007) conducted the identification of *A. phagocytophilum* with a PCR in a dog with tick infestation, acute onset of fever, ataxia, and lethargy. The commercial PCR kit protocols which were prepared specifically for *A. phagocytophilum* were used in this study. The bands with 444 bp long were obtained as a result of the amplification of the positive control and positive samples in the kit protocol. Three (3.1%) of 97 stray dogs in total were found to be infective. In Turkey, a few molecular studies, which were conducted on *A. phagocytophilum* in dogs by using the conventional and Real-Time PCR techniques, were reported. Pasa et al. (2009) reported that 4 of 10 dogs had been infected with *A. phagocytophilum* in a study conducted using conventional PCR in the Aegean Region. Duzlu et al. (2014) detected *A. phagocytophilum* at 7.8% in a molecular study conducted on dogs in the Kayseri region by using Real Time PCR technique. In this study, the molecular prevalence of *A. phagocytophilum* in the dogs of Batman province was detected to be 3.1%. This result was found to be in parallel with the prevalence rates reported from the Aegean Region and the Kayseri region.

CONCLUSION

Granulocytic anaplasmosis has been investigated for the first time in the stray dogs living in Batman province and found to be low. However, it is considered that the study has contributed epidemiologically to the data on the spread of the disease throughout Turkey. More extensive studies, in which vectors are investigated and serological methods are included, are needed in order to reveal this parasite, which has a zoonotic potential for humans, in more detail.

REFERENCES

- Aktas M, Altay K, Dumanli N (2011). Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks Tick Borne Dis*, 2, 62-65.
- Aktas M, Vatanserver Z, Altay K, Aydin MF, Dumanli N (2010). Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 104, 10-15.
- Beall MJ, Chandrashekar R, Eberts MD, Cyr KE, Diniz PP, Mainville C, Hegarty BC, Crawford JM, Breitschwerdt EB (2008). Serological and molecular prevalence of *Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, and *Ehrlichia* species in dogs from Minnesota. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 8, 455-464.
- Björnsdóttir A, Christenson D, Johnsson A, Sjöström AC, Madigan JE (1990). *Ehrlichia equi*-infektion diagnostiserat hos häst (In Swedish). *Svensk Veterinärtidning*, 42, 357-360.
- Carrade D, Foley JE, Borjesson DL, Sykes JE (2009). Canine Granulocytic Anaplasmosis: A Review. *J Vet Intern Med*, 23(6), 1129-1141.
- Christova I, Gladnishka T (2005). Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in rodenst from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. *Ann Agric Environ Med*, 12, 149-152.
- Duzlu O, Inci A, Yildirim A, Onder Z, Ciloglu A (2014). Köpeklerde kene kaynaklı bazı protozoon ve rickettsial enfeksiyonların Real Time PCR ile araştırılması ve saptanan izolatların moleküler karakterizasyonları. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 61, 275-282.
- Ebani VV, Bertelloni F, Turchi B, Cerri D (2013). Serological and molecular survey of *Anaplasma phagocytophilum* in Italian hunting dogs. *Ann Agric Environ Med*, 20(2), 289-292.
- Eberts MD, Diniz PP, Beall MJ, Stillman BA, Chandrashekar R, Breitschwerdt EB (2011). Typical and atypical manifestations of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*, 47, 88-94.
- Huber D, Rei J, Duvnjank S, Jurković D, Lukačević D, Pilat M, Beck A, Mihaljević Z, Vojta L, Polkinghorne A, Beck R (2017). Molecular detection of *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Wolbachia* sp. but not *Ehrlichia canis* in Croatian dogs. *Parasitol Res*, 116, 3019-3026
- Jenkins A, Kristiansen BE, Allum AG, Aakre RK, Strand L, Kleveland EJ, et al. (2001). *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Ehrlichia* spp. in Ixodes ticks from southern Norway. *J Clin Microbiol* 39, 3666-3671.
- Jennifer L Granick, P Jane Armstrong, Jeff BB (2009). *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs: 34 cases (2000-2007). *J Am Vet Med Assoc*, 234(12), 1559-1565.
- Karagenc T, Hosgor M, Bilgic HB, Pasa S, Kirli G, Eren H (2005). The determination of the prevalence of *E. canis*, *A. phagocytophila*, *A. platys* with nested PCR in dogs in the Aegean Region. İzmir, Turkey: 14th National Parasitology Congress, p. 18-25.
- Liz JS, Anderes L, Sumner JW, Massung RF, Gern L, Rutti B, Brossard M (2000). PCR detection of granulocytic ehrlichia in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J Clin Microbiol*, 39(2), 828.
- Madewell BR, Gribble DH (1982). Infection in two dogs with an agent resembling *Ehrlichiaequi*. *J Am Vet Med Assoc*, 180, 512-514.
- Massung RF, Slater KG (2003). Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J Clin Microbiol*, 41, 717-722.
- Melter O, Stehlik I, Kinska H, Volfova I, Ticha V, Hulinska D (2007). Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: a case report. *Vet Med (Praha)*, 52, 207-212.
- Passamonti F, Veronesi F, Cappelli K, Capomaccio S, Coppola G, Marenzoni ML, Piergili FD, Verini SA, Coletti M (2010). *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks: a preliminary survey of Central Italy. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 73-83.
- Pasa S, Kiral F, Karagenc T, Atasoy A, Seyrek K (2009). Description of dogs naturally infected with *Hepatozoon canis* in the Aegean region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 33, 289-295.
- Petrovec M, Lotric Furlan S, Zupanc TA, Strle F, Brouqui P, Roux V, et al. (1997). Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J Clin Microbiol* 35, 1556-1559.
- Potkonjak A, Vracar V, Savić S, Lako B, Radosavljević V, Cincović M, Suvajdzic L, Jurisic A, Petrovic A (2015). The seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection in dogs in the canine babesiosis, Serbia. *Veterinarski Arhiv*, 85, 385-394.
- Sainz A, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L (2015). Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. *Parasitol Vectors*, 8, 75.
- Santos HA, Pires MS, Vilela JA, Santos TM, Facinni JL, Baldani CD, Thome SM, Sanavria A, Massard CL (2011). Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*, 23, 770-774
- Sen E, Uchishima Y, Okamoto Y, Fukui T, Kadosaka T, Ohashi N, Masuzawa T (2011). Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks from Istanbul metropolitan area and rural Trakya (Thrace) region of north-western Turkey. *Ticks Tick-borne Dis*, 2(2), 94-98.
- Ulutas B, Bayramli G, Karagenc T (2007). First case of *Anaplasma (Ehrlichia) platys* infection in a dog in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 31(4), 279-282.
- Vargas-Hernandez MR, André DM, Cendales KCM, de Sousa LR, Gonçalves MCH, Rondelli, Machado RZ, Tinucci-Costa M (2016). Molecular detection of *Anaplasma* species in dogs in Colombia. *Rev. Bras. Parasitol Veterinária*, 25, 459-464.
- Woldehiwet Z (2010). The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol*, 167(2-4), 108-22.





Protective Effect of Chitosan Against Lead-Induced Oxidative Stress in Rat Kidney

Uğur ÖZDEK¹ Hasan TOZ² Ahmet Ufuk KÖMÜROĞLU¹ Leyla MİS³
Zübeyir HUYUT⁴ Yeter DEĞER²

¹ Van Yüzüncü Yıl University, Health Services Vocational School, Van, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

³ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Van, Turkey

⁴ Van Yüzüncü Yıl University, Medical Faculty, Department of Biochemistry, Van, Turkey

Received: 04.10.2019

Accepted: 08.11.2019

ABSTRACT

Chitosan is a natural polymer with antioxidant and chelating properties. This study investigated the effects of chitosan on lead (Pb), malondialdehyde (MDA), 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG), glutathione (GSH), ceruloplasmin concentrations and catalase (CAT) activity in the kidney tissue of the rats exposed to lead. 28 male Wistar albino rats were divided into four groups of eight each: control (C), lead group (Pb group), lead+chitosan (Pb+CS group), and chitosan (CS group). The lead group was administered 50 mg/kg lead acetate intraperitoneally (ip) for 5 days, and the chitosan groups (CS+Pb and CS groups) were administered 200 mg/kg chitosan for 28 days via gavage. At the end of the study, Pb, MDA, 8-OHdG, ceruloplasmin, GSH concentrations and catalase activity were measured in the kidney tissue. In the Pb-treated groups when compared with the control group, Pb, MDA, 8-OHdG, ceruloplasmin concentrations were significantly increased, and GSH concentration and catalase activity were significantly decreased ($p<0.05$). Co-administration of chitosan with lead significantly decreased Pb, MDA, and ceruloplasmin levels and significantly increased CAT activity in the kidney tissue ($p<0.05$). There were no significant changes in GSH and 8-OHdG levels ($p>0.05$). The obtained results show that chitosan protects the kidney against lead-induced oxidative stress.

Keywords: Chitosan, Lead, Kidney, Oxidative stress, Antioxidant

ÖZ

Rat Böbrek Dokusunda Kurşunun Neden Olduğu Oksidatif Strese Karşı Kitosanın Koruyucu etkisi

Kitosan antioksidan ve şelatör özelliğe sahip doğal bir polimerdir. Bu çalışmada kurşun toksikasyonu oluşturulmuş ratların böbrek dokusu kurşun (Pb), malondialdehit (MDA), 8-hidroksi deoksiguanozin (8-OHdG), glutatyon (GSH), seruloplazmin konsantrasyonu ve katalaz aktivitesi üzerine kitosanın etkisi araştırıldı. Her grupta sekiz adet olacak şekilde 28 adet erkek Wistar albino rat, kontrol (C), kurşun grubu (Pb grubu), kurşun+kitosan (Pb+CS grubu) ve kitosan (CS grubu) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Kurşun grubuna 5 gün, 50 mg/kg kurşun asetat intraperitoneal (ip) ve kitosan gruplarına (CS+Pb ve CS grupları) 28 gün boyunca 200 mg/kg kitosan gavaj yoluyla uygulandı. Çalışma sonunda, kurşun, MDA, 8-OHdG, seruloplazmin, GSH konsantrasyonu ve katalaz aktivitesi böbrek dokusunda ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, Pb uygulanan gruplarda böbrek dokusunda Pb, MDA, 8-OHdG ve seruloplazmin seviyesi arttı, GSH seviyesi ile katalaz aktivitesi ise azaldı ($p<0.05$). Kurşun ile birlikte kitosan verilmesi böbrek dokusunda Pb, MDA ve seruloplazmin seviyelerini azalttı, CAT aktivitesini arttırdı ($p<0.05$). GSH ve 8-OHdG seviyelerinde önemli değişiklik olmadı ($p>0.05$). Elde edilen sonuçlar, kitosanın, kurşun uygulaması oluşan oksidatif stresetken böbreği koruduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kitosan, Kurşun, Böbrek, Oksidatif stres, Antioksidan

INTRODUCTION

Kidney is an organ that maintains the internal environment of the body. The renal tubular system is susceptible to damage caused by environmental chemicals

and drugs. Heavy metals can cause kidney damage, such as nephrotoxicity (Liu et al. 2009; Matos et al. 2009). Lead induces tumor formation in different organs, but it is most commonly associated with kidney cancer in rodents. Renal adenoma and/or adenocarcinoma often occur in rats

chronically exposed to lead ingestion (Tokar et al. 2010). Lead poisoning is thought to be caused by oxidative stress. Recent studies have shown that lead induces excessive production of reactive oxygen radicals such as hydroxy peroxide (HO₂-), hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂-), and hydroxyl (OH-) (Bokar et al. 2008; Ercal et al. 1996; Sivaprasad et al. 2004). Living organisms have antioxidant defense systems that prevent the formation of reactive oxygen radicals and protect against harmful effects caused by them. The increase of reactive oxygen radicals leads to oxidative stress that causes damage to cellular macromolecules containing proteins, lipids, and nucleic acids. Oxidative stress plays a role in the pathology of cancer, atherosclerosis, diabetes, and other diseases (Finkel and Holbrook 2000; Halliwell et al. 1992; Pande and Flora 2002).

Chelation therapy is used as a medical treatment against lead poisoning. Chelates such as calcium disodium EDTA, dimercaprol, and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid are useful in the elimination of lead by forming insoluble compounds with lead (Ercal et al. 1996; Florar et al. 1995; Flora and Pachauri 2010; Patrick 2006; Sivaprasad et al. 2004). However, the frequent clinical use of these synthetic chelating agents is limited due to their side effects (Flora et al. 1995; Flora and Pachauri 2010; Patrick 2006). Recent studies have suggested that antioxidant treatments prevent the formation of reactive oxygen species or capture free radicals and that cellular oxidizable substrates can relieve or delay lead-induced oxidation damage (Finkel and Holbrook 2000; Flora 2009; Halliwell et al. 1992). In recent years, there has been an intense effort to develop and find safe and natural antioxidants. The effect of different protectors against kidney damage due to lead has been investigated (Wang et al. 2012).

Foodborne diseases are serious problem, both in developed and developing countries, causing a significant social and economic burden (Martins et al. 2012). The most frequent cause of outbreaks are mass catering and food service facilities (Todd et al. 2007). Therefore, the European Commission has recognized the importance of controlling food-poisoning outbreaks owing to the increasing number of meals consumed outside the home, in parallel with the ever-expanding range of pre-prepared meals. This changing consumer lifestyle emphasizes the need for better, effective ways of controlling food hygiene (Baş et al. 2006).

It has been shown that the reactive hydroxyl and amine groups of chitosan (a natural cationic polysaccharide) inhibit the formation of reactive oxygen radicals and prevent lipid peroxidation in biological systems (Chien et al. 2007; Je and Kim 2006; Kim and Thomas 2007; Park et al. 2004; Xing et al. 2005). Chitosan is seen as a useful candidate for non-toxic substances thanks to its antioxidant property (Wang et al. 2012). Today, many studies focus on antioxidant effects of chitosan (Guo et al. 2006; Guo et al. 2005; Guo et al. 2008; Je and Kim 2006; Jurczuk et al. 2006; Liu et al. 2009; Park et al. 2004; Sun et al. 2004; Sun et al. 2008; Xing et al. 2005; Yang et al. 2010). This study investigated the effects of chitosan in MDA, 8-OHdG, GSH and ceruloplasmin levels and CAT activity in kidney of Pb-treated rats.

MATERIALS and METHODS

Kidney tissue of rats used in the study named "The effect of chitosan on the erythrocyte antioxidant potential of lead toxicity-induced rats" was used in the research (Toz and Deger 2017).

Animal material

Twenty-eight Wistar albino rats, which weighed 200-250 g, which were bred in the animal Experiment Unit of Van Yüzüncü Yıl University, were utilized in the study. The rats were divided into four groups as seven rats in each group, and were kept in cages where they were provided with ad libitum feed and water at a temperature of 22±2°C and under 12-h dark and 12-h light cycles.

For the present study, an approval was obtained from the Local Animal Experiments Ethics Committee at Van Yüzüncü Yıl University on 05.09.2014, with the number 2014/10.

Study groups

The rats were divided into four groups as seven rats in each group, and the following items were administered to each group in the study.

The Control Group (C): Only saline solution was administered to the rats in this group for 28 days via oral gavage.

The Lead Group (Pb Group): The rats in this group were administered 50 mg/kg lead acetate dissolved in saline solution for 5 days intraperitoneally (ip) (Mutlu et al. 2011).

The Lead + Chitosan Group (Pb + CS group): The rats in this group were administered 50 mg/kg lead acetate ip for 5 days. At the same time, 200 mg/kg chitosan was dissolved in saline solution and administered for 28 days by oral gavage (Jeon et al. 2003).

The Chitosan Group (CS group): 200 mg/kg chitosan was dissolved in saline solution and administered by oral gavage for 28 days in this group.

At the end of the trial period, intraperitoneal 75 mg/kg ketamine HCl was injected, and the blood was collected by heart puncture. Then, the collected blood was centrifuged at +4°C, at 3000 rpm for 5 min to obtain serum. Urea and creatinine analyses in the extracted serum were measured on an autoanalyzer (Roche/Hitachi) using commercial kits.

The rats were immediately sacrificed by bloodless method under ketamine anesthesia, and the kidney was excised. Samples of kidney tissue were homogenized in cold 0.1 mM phosphate buffer (pH 7.4) and centrifuged at 10,000 rpm at 4°C for 15 min. The MDA (Ledwozyw et al. 1986), GSH (Beutler et al. 1963) ceruloplasmin levels (Sunderman and Nomoto 1970) and CAT activity (Lartillot et al. 1998) were measured spectrophotometrically; and 8-OHdG levels were measured in the collected supernatants by using the ELISA commercial kits (Shanghai LZ biotech Co., Ltd., China)

Pb measurement in the kidney tissue

500 µL of 10% Triton X-100 was added to 250 µL of supernatant. This mixture was vortexed. 1250 µL of 10% (NH₄) H₂PO₄ and 3 mL of deionized ultra pure water were added to it (a total volume of 5ml). Then, the reading was done at the 283.3 nm wavelength in graphite furnace atomic absorption spectrometry (Graphite Furnace Atomizer, GFA-7000 Shimadzu) according to the calibration curve plotted for different standard concentrations using Pb cathode lamp (Hollow Cathode Lamp, Hamamatsu Photonics K.K Made in Japan). The obtained results were expressed as ngPb/g tissue (Reyes et al. 2000; Yahaya et al. 2011).

Statistical analysis

The results were expressed as the mean ± SEM of number of observation. Comparison of means carried out using one way analysis of variance (ANOVA) followed by Turkey

test to compare means between the different groups. In the analyses, the significance level was accepted as $p < 0.05$. All analyses were performed using SPSS (23.0) software.

RESULTS

Serum urea and creatinine concentrations were significantly higher in rats treated with lead than in controls animals. Serum urea and creatinine concentrations were significantly lower in rats treated with lead and chitosan than in rats treated with lead (Table 1) ($p < 0.05$).

In the Pb-treated groups (Pb, Pb+CS) when compared with the control group, the lead concentration in the kidney tissue was increased but decreased after administration of chitosan (Table. 2) ($p < 0.05$).

In the Pb-treated groups when compared with the control group, Pb, MDA, 8-OHdG, ceruloplasmin concentrations were significantly increased, and GSH concentration and catalase activity were significantly decreased ($p < 0.05$) (Table. 2). Co-administration of chitosan with lead significantly decreased Pb, MDA, and ceruloplasmin levels and significantly increased CAT activity in the kidney tissue ($p < 0.05$). There were no significant changes in GSH and 8-OHDG levels ($p > 0.05$).

Table 1. Serum urea and creatinine levels of rats treated with chitosan (200 mg/kg) for 28 days and with lead acetate (50 mg/kg) for 5 days

	C	Pb	Pb+CS	CS
Urea (mg/dl)	44.83±4.57 a	59.40±5.68 c	51.33±4.22 b	46,83±4.07 a, b
Creatinine (mg/dl)	0.54±0.08 a	0.66±0.03 b	0.57±0.06 a	0.55±0.06 a

Values are presented as mean ±SD (n=7). $p < 0.05$; the difference between group averages with different superscript letters on the same row is statistically significant

Table 2. Kidney malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), ceruloplasmin, 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels and CAT activity of rats treated with chitosan (200 mg/kg, vo) for 28 days and with lead acetate (50 mg/kg, ip) for 5 days

	C	Lead	Lead+CS	CS
Lead (ng/g)	16.244±2.457a	62.394±17.192b	35.814±8.250c	15.364±3.367a
MDA (nmol/g protein)	21.14±2.46 a	30.48±1.41 b	26.59±2.15 c	23.24±1.64 a
8-OHdG (ng/g protein)	3.98±0.59 a	5.74±1.28 b	5.25±0.31 b	4.04±0.55 a
GSH (mg/g protein)	1.13±0.11 a	0.85±0.05 b	0.88±0.03 b	1.08±0.016 a
Catalase (U/g protein)	8.82±0.62 a	2.70±0.32 b	5.25±0.41 c	8.74±0.38 a
Ceruloplasmin (mg/L protein)	8.769±2.285 a	25.447±4.607 b	18.060±5.61 c	9.397±4.145 a

Values are presented as mean ±SD (n=7). $p < 0.05$; the difference between group averages with different superscript letters on the same row is statistically significant

DISCUSSION

Lead-induced renal dysfunction is classified as acute and chronic nephropathy (Matovic et al. 2015). Lead-induced acute nephropathy is usually characterized by an impaired tubular transport mechanism (Fanconi syndrome), morphological changes of tubular epithelial cells, and lead-induced nuclear inclusion bodies (a lead-protein complex) (Matovic et al. 2015). Consistent with other studies, the present study found that the lead concentration in the kidney tissue was found to be significantly higher in the lead group than in the control group. It has been reported that this elevation occurred because lead binds strongly to macromolecules in the intracellular compartments (Abdel Moneim et al. 2011; Han et al. 1996). In this study, lead exposure was found to cause an increase in serum urea and creatinine levels indicating glomerular damage and renal dysfunction. The presence of lead causes the degradation of the brush border of renal epithelial cells impermeable to creatinine and urea. For these reasons, the renal function deteriorates, and blood urea and creatinine levels rise. Although the exact mechanism of renal lead

toxicity is not fully understood, it has been indicated that oxidative stress plays an important role (Matovic et al. 2015).

There is a limited number of studies on lead-induced oxidative stress in animal kidney tissue. The results of this study are consistent with other studies in the literature showing that there was an increase in MDA levels in rat kidney using lead 10-150 mg/kg for 24 hours (Sharma et al. 2014), 20 mg/kg for 5 days (Abdel Moneim et al. 2011), 5 mg/kg for 30 days (Lakshmi et al. 2013), 50 mg/kg for 40 days (Sharma et al. 2010), and 500 mg/L for 8 weeks (Wang et al. 2012). It has been reported that lead exposure stimulates free radical production in the kidney by leading to the inactivation of tubular cell structure and the loss of membrane integrity, and thus causes lipid peroxidation (Aziz et al. 2012; Sharma and Singh 2014).

Due to its stability, 8-OHdG is one of the most reliable markers of oxidative DNA damage (Li et al. 2010). Studies on cadmium, arsenic, methyl mercury, and ferric nitrotriacetate reported that there was an increase in 8-OHdG levels in the kidney (Galazyn et al. 2009; Iqbal et al. 2009; Jin et al. 2008). Liu et al. (2010) determined that the

8-OHdG level was significantly increased in the kidneys tissue of the rats exposed to 500 mg Pb/L in drinking water for 10 weeks and suggested that DNA is a common target of lead-induced ROS in the kidney. In our study, we found that the 8-OHdG level in the kidney tissue was significantly higher in the rats treated with lead compared to the controls.

The sulfhydryl groups of glutathione can act as a non-enzymatic antioxidant by directly interacting with ROS, or ROS is involved in enzymatic detoxification reactions as a cofactor or coenzyme. Because GSH is a tripeptide containing cysteine with reactive sulfhydryl groups that have a reduction potential (Hsu and Guo 2002; Sivaprasad et al. 2004). Studies showed that lead caused a significant reduction in GSH level and GSH/GSSH ratio in the kidney tissue (Aykin-Burns et al. 2003; Jurczuk et al. 2006; Lui et al. 2010; Sivaprasad et al. 2004). In the present study, the GSH level in the kidney tissue was significantly decreased in the rats treated with lead when compared with the control group. This reduction may have occurred because lead binds to the SH group of GSH (Lui et al. 2010).

Ceruloplasmin (a copper metalloenzyme) acts as an antioxidant due to its ferroxidase activity (Lee et al. 2015). However, when oxidative stress rises, it acts as a pro-oxidant by releasing free copper ions that induce the formation of reactive oxygen species and the oxidation of low-density lipoproteins (Shukla et al. 2006). It has been emphasized that elevated ceruloplasmin levels may be used as a strong marker of diabetic nephropathy (Lee et al. 2015). Increased levels of ceruloplasmin were found to be associated with oxidative stress (Mongiati et al. 1992). It was observed that there was an increase in ceruloplasmin levels in rats treated with 1,000 mg/L lead acetate for 4 weeks (Flora et al. 1993). In this study, the ceruloplasmin concentration was significantly higher in the kidney tissue of the rats treated with lead. The increase in ROS levels induced by lead causes the antioxidant defense system to weaken. Animal and human studies showed that lead changed SOD, CAT, GPx, GST and G6PD activities and GSH level (Matovic et al. 2015). Experimental studies revealed that long-term i.p. (Abdel Moneim et al. 2011; Lakshmi et al. 2013) and oral administration (Farmand et al. 2005; Bas et al. 2015; Sharma et al. 2010; Wang et al. 2012) of Pb significantly reduced the activities of antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and GPx in the kidney tissue. The molecular structures and activities of these enzymes depend on a variety of essential elements, so antioxidant enzymes are potential targets for lead (Lui et al. 2010). In the present study, the catalase activity was found to be significantly lower in the lead-treated groups compared to the control group. This reduction may be due to increased reactive oxygen species production.

After recent studies have shown that lead induces oxidative stress by deteriorating the antioxidant defense system, antioxidant therapy has gained importance (Wang et al. 2016). Chitosan exhibits antioxidant activity as a natural cationic polysaccharide. Mechanisms related to the antioxidant activity of chitosan include free-radical-scavenging action, metal-ion-chelating ability, and reducing activity (Chien et al. 2007; Kim and Thomas 2007; Onsoy and Skaugrud 1990; Park et al. 2004; Sun et al. 2004). In the present study, co-administration of chitosan with lead significantly decreased Pb, MDA, and ceruloplasmin levels and significantly increased CAT activity in the kidney tissue. The decreased level of lead in the kidney tissue may be due mainly to the chelating property of chitosan with heavy metals. In this context, the

antioxidant levels may have increased in relation to the reduction in ROS production.

CONCLUSION

Current study revealed that chitosan protects the kidney against lead-induced oxidative stress.

REFERENCES

- Abdel Moneim AE, Dkhil MA, Al-Quraishy S (2011).** The protective effect of flaxseed oil on lead acetate-induced renal toxicity in rats. *J Hazard Mater*, 194, 250-255.
- Aykin-Burns N, Laegeler A, Kellogg G, Ercal N (2003).** Oxidative effects of lead in young and adult Fisher 344 rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 44, 0417-0420.
- Aziz F, Maulood I, Chawsheen M (2012).** Effects of melatonin, vitamin C alone or in combination on lead-induced injury in liver and kidney organs of rats. *IOSR J Pharm*, 2 (5), 13-18.
- Bas H, Kalender Y, Pandir D, Kalender S (2015).** Effects of lead nitrate and sodium selenite on DNA damage and oxidative stress in diabetic and non-diabetic rat erythrocytes and leucocytes. *Environ Toxicol Pharmacol*, 39, 1019-1026.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM (1963).** Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 61, 882-888.
- Bokara KK, Brown E, McCormick R, Yallapragada PR, Rajanna S, Bettiya R (2008).** Lead-induced increase in antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in developing rat brain. *Biomaterials*, 21, 9-16.
- Chien PJ, Sheu F, Huang WT, Su MS (2007).** Effect of molecular weight of chitosans on their antioxidative activities in apple juice. *Food chemistry*, 102, 1192-1198.
- Ercal N, Treeratphan P, Hammond TC, Matthews RH, Grannemann NH, Spitz DR (1996).** In vivo indices of oxidative stress in lead-exposed C57BL/6 mice are reduced by treatment with meso-2,3-dimercaptosuccinic acid or N-acetylcysteine. *Free Radic Biol Med*, 21, 157-161.
- Farmand F, Ehdai A, Roberts, C. K., Sindhu, R. K. (2005).** Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res*, 98, 33-39.
- Finkel T, Holbrook NJ (2000).** Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239-247.
- Flora SJ (2009).** Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cell Longev*, 2, 191-206.
- Flora SJ, Bhattacharya R, Vijayaraghavan R (1995).** Combined therapeutic potential of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and calcium disodium edetate on the mobilization and distribution of lead in experimental lead intoxication in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 25, 233-240.
- Flora SJ, Pachauri V (2010).** Chelation in metal intoxication. *Int J Environ Res Public Health*, 7, 2745-2788.
- Flora S, Jeevaratnam K, Kumar D (1993).** Preventive effects of sodium molybdate in lead intoxication in rats. *Ecotoxicol Environ Saf*, 26, 133-137.
- Galazyn-Sidorczuk M, Brzoska MM, Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J (2009).** Oxidative damage to proteins and DNA in rats exposed to cadmium and/or ethanol. *Chem Biol Interact*, 180, 31-38.
- Guo Z, Liu H, Chen X, Ji X, Li P (2006).** Hydroxyl radicals scavenging activity of N-substituted chitosan and quaternized chitosan. *Bioorg Med Chem Lett*, 16, 6348-6350.
- Guo Z, Xing R, Liu S, Yu H, Wang P, Li C, Li P (2005).** The synthesis and antioxidant activity of the Schiff bases of chitosan and carboxymethyl chitosan. *Bioorg Med Chem Lett*, 15, 4600-4603.
- Guo Z, Xing R, Liu S, Zhong Z, Li P (2008).** Synthesis and hydroxyl radicals scavenging activity of quaternized carboxymethyl chitosan. *Carbohydr Polym*, 73, 173-177.
- Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE (1992).** Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med*, 119, 598-62.
- Han S, Qiao X, Simpson S, Ameri P, Kemp FW, Bogden JD (1996).** Weight loss alters organ concentrations and contents of lead and some essential divalent metals in rats previously exposed to lead. *J Nutr*, 126, 317-323.
- Hsu PC, Guo YL (2002).** Antioxidant nutrients and lead toxicity. *Toxicology*, 180, 33-44.
- Iqbal M, Okazaki Y, Okada S (2009).** Curcumin attenuates oxidative damage in animals treated with a renal carcinogen, ferric

- nitriilotriacetate (Fe-NTA): implications for cancer prevention. *Mol Cell Biochem*, 324, 157-164.
- Je JY, Kim SK (2006)**. Reactive oxygen species scavenging activity of aminoderivatized chitosan with different degree of deacetylation. *Bioorg Med Chem*, 14, 5989-5994.
- Jeon TI, Hwang SG, Park NG, Jung YR, Im Shin S, Choi SD, Park DK (2003)**. Antioxidative effect of chitosan on chronic carbon tetrachloride induced hepatic injury in rats. *Toxicology*, 187, 67-73.
- Jin X, Chan HM, Lok E et al. (2008)**. Dietary fats modulate methylmercury-mediated systemic oxidative stress and oxidative DNA damage in rats. *Food Chem Toxicol*, 46, 1706-1720.
- Jurczuk M, Moniuszko-Jakoniuk J, Brzoska MM (2006)**. Involvement of some low-molecular thiols in the peroxidative mechanisms of lead and ethanol action on rat liver and kidney. *Toxicology*, 219, 11-21.
- Kim KW, Thomas R (2007)**. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights. *Food chemistry*, 101, 308-313.
- Lakshmi BV, Sudhakar M, Aparna M (2013)**. Protective potential of Black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 35, 361-368.
- Lartillot S, Kedziora P, Athias A (1988)**. Purification and characterization of a new fungal catalase. *Prep Biochem*, 18, 241-246.
- Ledwozyw A, Michalak J, Stepień A, Kadziolka A (1986)**. The relationship between plasma triglycerides, cholesterol, total lipids and lipid peroxidation products during human atherosclerosis. *Clinica chimica acta*, 155, 275-283.
- Lee MJ, Jung CH, Kang YM et al. (2015)**. Serum Ceruloplasmin Level as a Predictor for the Progression of Diabetic Nephropathy in Korean Men with Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*, 39, 230-239.
- Li Z, Piao F, Liu S, Wang Y, Qu S (2010)**. Subchronic exposure to arsenic trioxide-induced oxidative DNA damage in kidney tissue of mice. *Exp Toxicol Pathol*, 62, 543-547.
- Liu CM, Ma JQ, Sun YZ (2010)**. Quercetin protects the rat kidney against oxidative stress-mediated DNA damage and apoptosis induced by lead. *Environ Toxicol Pharmacol*, 30, 264-271.
- Liu CM, Zheng YL, Lu J et al. (2010)**. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol*, 29, 158-166.
- Liu J, Sun H, Dong F et al. (2009)**. The influence of the cation of quaternized chitosans on antioxidant activity. *Carbohydr Polym*, 78, 439-443.
- Matos RC, Vieira C, Morais S, de Lourdes Pereira M, de Jesus JP (2009)**. Nephrotoxicity of CCA-treated wood: A comparative study with As(2)O(5) and CrO(3) on mice. *Environ Toxicol Pharmacol*, 27, 259-263.
- Matovic V, Buha A, Ethukic-Cosic D, Bulat Z (2015)**. Insight into the oxidative stress induced by lead and/or cadmium in blood, liver and kidneys. *Food Chem Toxicol*, 78, 130-140.
- Mongiati R, Gerli GC, Locatelli GF, Fortuna R, Petazzi A (1992)**. Erythrocyte antioxidant system and serum ceruloplasmin levels in welders. *Int J Occup Environ Health*, 64, 339-342.
- Mutlu N, Ersan Y, Nur G, Koç E (2011)**. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester against lead acetate-induced hepatotoxicity in mice. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 1-5.
- Onsoyen E, Skaugrud O (1990)**. Metal recovery using chitosan. *J Chem Technol Biotechnol*, 49, 395-404.
- Pandé M, Flora SJ (2002)**. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*, 177, 187-196.
- Park PJ, Je JY, Kim SK (2004)**. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. *Carbohydr Polym*, 55, 17-22.
- Patrick L (2006)**. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*, 11, 2-22.
- Reyes H, Baez ME, Gonzalez MC et al. (2000)**. Selenium, zinc and copper plasma levels in intrahepatic cholestasis of pregnancy, in normal pregnancies and in healthy individuals, in Chile. *J Hepatol*, 32, 542-549.
- Saxena G, Flora SJ (2004)**. Lead-induced oxidative stress and hematological alterations and their response to combined administration of calcium disodium EDTA with a thiol chelator in rats. *J Biochem Mol Toxicol*, 18, 221-233.
- Sharma S, Singh B (2014)**. Effects of acute and chronic lead exposure on kidney lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in BALB-C mice (*Mus musculus*). *Int J Sci Res*, 3, 1564-1566.
- Sharma V, Sharma A, Kansal L (2010)**. The effect of oral administration of *Allium sativum* extracts on lead nitrate induced toxicity in male mice. *Food Chem Toxicol*, 48, 928-936.
- Shukla N, Maher J, Masters J, Angelini GD, Jeremy JY (2006)**. Does oxidative stress change ceruloplasmin from a protective to a vasculopathic factor? *Atherosclerosis*, 187, 238-250.
- Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P (2004)**. Combined efficacies of lipoic acid and 2,3-dimercaptosuccinic acid against lead-induced lipid peroxidation in rat liver. *J Nutr Biochem*, 15, 18-23.
- Sun T, Xie W, Xu P (2004)**. Superoxide anion scavenging activity of graft chitosan derivatives. *Carbohydr Polym*, 58, 379-382.
- Sun T, Yao Q, Zhou D, Mao F (2008)**. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorg Med Chem Lett*, 18, 5774-5776.
- Sunderman, FWJr, Nomoto S (1970)**. Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylenediamine oxidase activity. *Clin chem*, 16, 903-910.
- Tokar EJ, Diwan BA, Waalkes MP (2010)**. Early life inorganic lead exposure induces testicular teratoma and renal and urinary bladder preneoplasia in adult metallothionein-knockout mice but not in wild type mice. *Toxicology*, 276, 5-10.
- Toz H, Deger Y (2017)**. The Effect of Chitosan on the Erythrocyte Antioxidant Potential of Lead Toxicity-Induced Rats. *Biol Trace Elem Res*, 184 (1), 114-118.
- Wang J, Yang Z, Lin L, Zhao Z, Liu Z, Liu X (2012)**. Protective effect of naringenin against lead-induced oxidative stress in rats. *Biol Trace Elem Res*, 146, 354-359.
- Wang Z, Yan Y, Yu X, Li W, Li B, Qin C (2016)**. Protective effects of chitosan and its water-soluble derivatives against lead-induced oxidative stress in mice. *Int J Biol Macromol*, 83, 442-449.
- Xie W, Xu P, Liu Q (2001)**. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 11, 1699-1701.
- Xing R, Yu H, Liu S, et al. (2005)**. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro. *Bioorg Med Chem*, 13, 1387-1392.
- Yahaya MI, Ogunfowokan AO, Orji EO (2011)**. Elemental profile in amniotic fluid of some Nigerian pregnant women. *East Afr J Public Health*, 8, 92-97.
- Yang S, Guo Z, Miao F, Xue Q, Qin S (2010)**. The hydroxyl radical scavenging activity of chitosan, hyaluronan, starch and their O-carboxymethylated derivatives. *Carbohydr Polym*, 82, 1043-1045.





The Effect of Evening Primrose Oil (*Oenothera Biennis*) on Insulin, Resistin and Adiponectin in Experimental Diabetes Induced by STZ

İnci SÖĞÜTLÜ¹ İlyas KOÇ² Handan MERT² Leyla MİS³ Nihat MERT²

¹ Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Food and Control Department of Food Enterprises and Codex, Ankara, Turkey

² Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Van, Turkey

³ Van Yüzüncü Yıl University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Van, Turkey

Received: 07.10.2019

Accepted: 17.10.2019

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a disease with high morbidity and mortality, which is characterized by a lack of insulin secretion and resistance to tissues in the tissues. In this study, 32 healthy Wistar Albino female rats, 7-8 weeks old, with a live weight of 300-350 grams obtained from Yüzüncü Yıl University Experimental Animals Unit were used. The rats were randomly divided into 4 groups of 8 rats. The rats in the control group were not given any compound other than feed and water. Second Group: 45 mg/kg single dose streptozotocin i.p. applied. After 72 hours, glucose levels were determined in the blood samples taken from the tail vein. Diabetic patients whose blood sugar levels were 250 mg/dl and above were considered diabetic. Third group: Evening Primrose Oil (EPO); rats were given oral EPO at a dose of 0.1 ml/rat/day for 20 days Fourth Group: Diabetes + EPO group. Rats with diabetes were given primrose oil catheter with a dose of 0.1 ml/rat/day for 20 days. Blood samples were taken from the heart after the experimental applications and plasma obtained was used for insulin, resistin and adiponectin analysis. Fasting glucose levels were determined by glucometry and other parameters were determined by ELISA method. Fasting glucose, insulin and resistin levels increased while adiponectin level decreased in diabetic group. When primrose oil was given to this group, the values changed significantly at the level of $p \leq 0.05$. These results show that primrose oil can be used in the treatment of Type 2 diabetes by having a restorative effect on changes in some negative biochemical parameters seen in diabetes.

Keywords: Evening Primrose Oil, Rat, İnsulin, Resistin, Adiponectin

öz

STZ ile Oluşturulan Deneysel Diabette Çuha Çiçeği Yağının (*Oenothera Biennis*) İnsülin, Resistin ve Adiponektin Üzerine Etkisi

Diabetes mellitus; insülin sekresyonundaki azlık ve dokularda insüline karşı gelişen direnç ile şekillenmiş, morbidite ve mortalitesi yüksek olan bir hastalıktır. Araştırmada Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Ünitesi'nden sağlanan olan 300-350 gram canlı ağırlıkta 7-8 haftalık 32 sağlıklı Wistar Albino dişi rat kullanıldı. Rastgele 8'er sıçandan oluşmuş 4 gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ratlara yem ve su dışında herhangi bir bileşik verilmedi. İkinci Grup: Diyabet grubundaki ratlara 45 mg/kg tek doz streptozotocin i.p. yoldan uygulandı. 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz düzeyleri saptandı kan şekerleri 250 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi. Üçüncü grup: Çuha çiçeği grubundaki ratlara ağızdan sonda ile 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı 20 gün süreyle verildi. Dördüncü Grup: Diyabet+Çuha çiçeği yağı grubunda, diyabetli ratlara yine 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı sonda ile ağızdan 20 gün süreyle verildi. Deneysel uygulamalardan sonra kalpten kan örnekleri alındı ve elde edilen plazmalar insülin, resistin, adiponektin analizlerinde kullanıldı. Açlık Glukoz düzeyleri glukometrik, diğer parametreler ise ELISA yöntemiyle saptandı. Diyabetli ratlarda glukoz, insülin ve resistin düzeyleri artarken adiponektin düzeyi azalmış, bu gruba çuha çiçeği yağı verilince değerler $p \leq 0.05$ düzeyinde önemle pozitif yönde değişmiştir. Bu sonuçlar çuha çiçeği yağının diyabette görülen bazı olumsuz biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri onarıcı yönde etki ederek Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Çuha çiçeği yağı, Rat, İnsülin, Resistin, Adiponektin

GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), insülin hormonunun mutlak yokluğu ya da insülin etkisinin azalması sonucu gelişen akut komplikasyonlarıyla hiperozmolar hiperglisemik sendrom (HHS),diyabetik ketoasidoz (DKA) ve hipoglisemi ile ölüme neden olan, kronik komplikasyonlarıyla (retinopati, nefropati, nöropati, ateroskleroz, kardiyovasküler yan etki, beyin atardamarlarında değişimler ve bunlara bağlı hemoraji ve trombozlar) yaşam kalitesini azaltan, karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasının bozulmasıyla birlikte seyreden kronik metabolik bir hastalıktır. Tip 2 diyabet, genelde 40 yaşından sonra meydana gelen, yaşlandıkça ortaya çıkma sıklığı artan, diyabet semptomlarının hafif olduğu, bazen de hiç olmadığı, kronik komplikasyonların sıklıkla görüldüğü ve dünyada en çok görülen diyabet tipidir. Obezite, dokularda insülinin kullanılmaması (insülin direnci) ve insülin salgısının eksikliği ile karakterizedir. Diyabet hastalarının tümünde yaklaşık olarak %90'ı Tip 2 diyabetlidir (Barry ve ark. 2004). Çuha çiçeği bitkisinin (oenothera biennis) tohumlarının soğuk sıkım veya solvent ekstraksiyonu methoduyla elde edilir (Blumenthal ve ark. 2003). İşlenmemiş haldeki çuha çiçeği yağı, özüt olarak aralarında tokoferollerinde bulunduğu yüksek miktarda antioksidan kapasitesine sahiptir. Tokoferoller damıtma aşamasında ayrılır (Jennifer ve ark. 2001). Çuha çiçeğinin tohumları omega-3 yağ asitlerinin türleri olan gama-linoleik asit (GLA), cis-linoleik asit yönünden zengindir (Fugate ve Church 2004). GLA, aktif bir prostaglandin E ve türevlerinin ön maddesi olması nedeniyle klinik farmakoloji alanında çok rağbet gören esansiyel bir yağ asididir (Jennifer ve ark. 2001; Birch ve ark. 2001). Çuha çiçeği yağı, meme ağrısı (mastalji), menopozal ve premenstrual semptomlarında, servikal olgunlaşma, doğumun başlaması veya doğumun hızlandırılması gibi kadınların çoğu sağlık problemlerinde kullanılır. DM, kanser, astım, preeklampsi, şizofreni ve dikkat kaybı/hiperaktivite gibi rahatsızlığın tedavisinde çuha çiçeğinin etkisi araştırılması devam etmektedir (Libster ve ark. 2002).

Adiponektin, önerildiği üzere insülin direnci ve ateroskleroz gelişiminde rol oynayan yeni bir adiposit spesifik proteindir. Yüksek konsantrasyonlarda dolaşımda olmasına rağmen, adiponektin düzeyleri obez kişilerde zayıf deneklerden daha düşüktür. Adipozite ölçümleriyle negatif korelasyonların yanı sıra, insülin direnci ve tip 2 diyabet ile birlikte adiponektin düzeyleri de azalır. Viseral adipozitenin, adiponektinin bağımsız bir negatif prediktörü olduğu gösterilmiştir. Böylece, metabolik sendromun adiponektin ile negatif ilişkisinin çoğu özelliği gösterilmiştir. Tip 2 diyabet gelişiminden önce Adiponektin seviyelerinin azaldığı görülmekte olup, adiponektin uygulamasına daha düşük plazma glukoz seviyelerinin yanı sıra artan insülin duyarlılığı eşlik etmektedir. Ayrıca, adiponektinin azalmış ekspresyonu, hayvan çalışmalarında, insülin direnciyle ilişkili olarak hipodiponektinemi için bir rol olduğunu gösteren bir derecedeki insülin direnci ile ilişkilendirilmiştir Adipokinler otokrin, parakrin ve endokrin etkileri aracılığı ile metabolik süreçleri, inflamatuvar ve immunolojik reaksiyonları düzenlerler (Gülali ve ark. 2013).

Başlangıçta adiposit spesifik bir hormon olarak tanımlanan resistinin obezite, insülin direnci ve diyabet arasında önemli bir bağlantı olduğu öne sürülmüştür. Ekspresyonu başlangıçta adipositlerde tanımlanmış olmasına rağmen, insanlarda belirgin resistin ekspresyonu seviyeleri temel olarak mononükleer lökositlerde, makrofajlarda, dalakta

ve kemik iliğinde hücrelerde bulunur. Artan kanıtlar, resistinin çeşitli biyolojik işlemlerde insülin direnci ve diyabetteki rolünün yanı sıra önemli düzenleyici rol oynadığını göstermektedir: ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalık (CVD), alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı, otoimmün hastalık, malignite, astım, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve kronik böbrek hastalığı. CVD diyabetli ve diyabetsiz hastalarda önemli miktarda morbidite ve mortalite oluşturduğundan, resistin gibi adipokinlerin kardiyovasküler sistemde oynadığı rolün anlaşılması önemlidir (Jamaluddin ve ark. 2012).

İnsülin, kan şekeri seviyelerinin düzenlenmesinde anahtar rol oynayan bir hormondur. İnsülin eksikliği veya insüline yeterince cevap verememesi, her biri diyabet semptomlarının gelişmesine yol açabilir. İnsülin bu nedenle hücrelerin enerji için kullanılacak glikoz almasına yardımcı olur. Vücudunuzda yeterli enerji varsa, insülin karaciğere glikoz alıp glikojen olarak depolar. Karaciğer kütlelerinin yaklaşık %5'ine kadar glikojen depolayabilir. Vücuttaki bazı hücreler insülin olmadan glikoz alabilir, ancak çoğu hücrede insülin bulunması gerekir. Tip 2 diyabet, insüline etkin bir şekilde yanıt vermeyen vücut tarafından karakterize edilir. Buna insülin direnci denir. Sonuç olarak, vücut kandaki glikozu daha az alabilir. Tip 2 diyabetin erken evrelerinde, vücut normalde gerekenden daha fazla insülin üreterek cevap verir. Tip 2 diyabet birkaç yıl içerisinde gelişirse, pankreasta insülin üretme konusundaki ekstra talepler aşınırken insülin üreten hücrelerin (pankreas beta hücreleri) kaybına neden olabilir (Mert 1996).

Bu çalışmada STZ deneysel olarak diyabet oluşturulmuş ratlarda plazma adiponektin, resistin ve insülin seviyelerini tespit etmek, Çuha çiçeği yağının verilmesiyle bu değerlerde değişimin olup olmadığını yani diyabet üzerine Çuha çiçeği yağının iyileştirici etkisinin olup olmadığını araştırmak amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Araştırmada, Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırmalar Birimi'nden sağlanmış olan 300-350 gram canlı ağırlıkta,7-8 haftalık, 32 sağlıklı Wistar Albino dişi rat kullanıldı. Deney öncesinde ratların 7 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlandı. Araştırmada deneysel uygulamalar laboratuvar hayvanlarının bakım şartlarına (12 saat aydınlık: 12 saat karanlık ve 24±3°C) uygun olarak yürütüldü. Deneysel uygulamalar süresince ratlara standart ticari rat yemi (pellet yem) ve içme suyu ad libitum verildi.

Birinci Grup: Kontrol olarak tutulmuş olan 8 adet rata yem ve su dışında herhangi bir madde verilmedi (Kontrol Grubu).

İkinci Grup: Sekiz adet rattan oluşan hayvanların deney öncesi kan şekeri ölçüldü. Ratlara 45 mg/kg tek doz streptozotosin (STZ) (Sigma USA) pH 4.5 soğuk sitrat tamponu içinde çözüldü, i.p. yoldan uygulandı (Karabay ve ark., 2006). 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz düzeyleri, Lever Chek-TD-4222 marka Biosensor şeker ölçüm cihazı ve stripleri vasıtasıyla saptandı. Kan şekeri 250 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edilip çalışmaya dahil edildi (Diyabet Grubu).

Üçüncü Grup: 8 adet rata ağızdan sonda ile 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı 20 gün süreyle verildi (Çuha çiçeği yağı grubu) .

Dördüncü Grup: Sekiz adet rattan oluşan hayvanların deney öncesi kan şekerleri ölçüldü. Ratlara 45 mg/kg tek doz streptozotosin (STZ) (Sigma USA) pH 4.5 soğuk sitrat tamponu içinde çözündü, i.p. yoldan uygulandı (Karabay ve ark., 2006). 72 saat sonra kuyruk veninden alınan kan örneklerinde glukoz düzeyleri, Lever Chek-TD4222 marka Biosensor şeker ölçüm cihazı ve stripleri vasıtasıyla saptandı. Kan şekerleri 250 mg/dl ve üzerinde olanlar diyabetik olarak kabul edildi ve çalışmaya dahil edildi. Bu ratlara 20 gün süreyle sonda ile 0,1 ml/rat/gün dozunda çuha çiçeği yağı ağızdan verildi (Diyabet+Çuha çiçeği yağı grubu) (Koç 2016).

Araştırmada; Adiponektin (Rat adinopektin, ADP ELISA Cat.no: YLA 0076RA), resistin (Rat resistin Retn ELISA, Cat no: YLA 0203RA) ve insülin (Rat İnsülin, INS ELISA kit Cat no: YLA 0037RA) ticari YL biont marka ELISA kitleri, kit

prosedürüne göre ELISA okuyucu (Awarenes Stat Fax 2100 USA) ile çalışıldı.

Araştırmada elde edilen bulgular istatistiksel olarak değerlendirildi. Verilerin karşılaştırılmasında ikiden fazla grup durumunda, normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde ise Mann-WhitneyU testi kullanıldı.

BULGULAR

Deneyel diyabet oluşturulmuş ve beraberinde çuha çiçeği verilmiş gruplar dâhil olmak üzere tüm gruplara ait AKG, insülin, resistin ve adiponektin düzeyleri ve istatistiksel gösterimi Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Araştırmada kullanılan tüm grupların AKG, insülin, resistin ve adiponektin düzeyleri

Table 1. FBG, insulin, resistin and adiponectin levels of all groups used in the study

	n	AKG (mg/dl)	İnsülin (mIU/ml)	Resistin (pg/ml)	Adiponektin(mg/l)
Kontrol	8	95.12±7.56c	1.12±0.23c	0.35±0.08b	0.72±0.12a
ÇÇY	8	102.24±9.56c	1.38±0.19c	0.44±0.10b	0.65±0.16a
Diyabet	8	273.87±12.87a	2.26±0.36a	0.77±0.09a	0.32±0.09b
Diyabet+ ÇÇY	8	185.48±10.24b	1.95±0.21b	0.53±0.04b	0.63±0.11a

ÇÇY: Çuha Çiçeği Yağı - AKG: Açlık kan glukozu *Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak $p \leq 0.05$ düzeyinde önemi göstermektedir.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yağ dokusu hem enerji deposu olması hem de lipolitik aktivite özelliğinin yanı sıra, glukoz metabolizması, inflamasyon, enerji dengesi, lipid metabolizması, fibrinolitik sistem ve vasküler homeostazisi etkileyen bir takım proteinleri (adipokin) salgılayan en büyük endokrin organdır. Adipokinler otokrin, parakrin ve endokrin etkileri aracılığı ile metabolik süreçleri, inflamatuvar ve immunolojik reaksiyonları düzenlerler. Bu sayede hiperlipidemi, diabetes mellitus, arteriyel hipertansiyon, ateroskleroz ve kalp yetersizliği dahil olmak üzere obezite ile ilişkili komplikasyonlarda rol aldığı düşünülmektedir. Yağ hücrelerinden leptin, rezistin, tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), adiponektin, adipisin, interlökin-6 (IL-6), plazminojen aktivatör inhibitör-1 (PAI-1), transforming büyüme faktörü- α (TGF- α), anjiyotensinojen, asilasyon-stimüle edici protein (ASP), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), prostaglandin I2 (PGI2), prostaglandin-F2 α (PG-F2 α) gibi çok sayıda madde salgılanmaktadır. Bunlar arasında adiponektin antidiyabetik ve antiaterojenik bir proteindir ve konsantrasyonları, obezite ile ilişkili metabolik ve vasküler hastalıklarda azalmaktadır (ADA 2010). Çalışma sonucuna göre olan tip 2 diyabetlilerin adiponektin düzeyi olmayanlara göre daha düşük bulundu ($p \leq 0,05$). İnsülin miktarını artışı ve direnci ile adiponektin düzeyinin düştüğü saptandı. Bu iki tespit adiponektin seviyesini belirleyen önemli faktör olduğu, adiponektin seviyesi düşüklüğünün nedeni olabileceği sonucuna varıldı.

Resistin, adipokin ailesinden olan 108 aminoasitten oluşan 12.5 kDa ağırlığında sisteince zengin bir polipeptittir. Dişi gonodal yağ dokusunda en yüksek seviyelerde olmak üzere başlıca beyaz yağ dokusundan sekrete edilir (Patel ve ark. 2003). Resistinin adipositlerde ve iskelet kasında

GLUT-4'ten bağımsız olarak insüline bağlı glukoz alımını inhibe ettiği, hepatik glukoz üretimi üzerine insülinin etkisini bozduğu ve hepatositlerin glukoz alımını baskıladığı rapor edilmiştir (Rajala ve ark. 2003; Stepan ve ark. 2001). Bunlara dayanarak resistinin obezite ve insülin direnci ile ilişki olabileceği ileri sürülmektedir. Sunulan çalışmada da yukarıdaki ifadeleri destekleyecek nitelikte bulgular elde edilmiştir. Zira diyabet grubunda resistin düzeylerindeki artış yine aynı grupta insülin artışıyla beraber görülmektedir.

Tokuyama ve ark. (2007) tip 2 diyabetli hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada adipokinler ve metabolik parametrelerin korelasyonunu araştırmış ve resistin ile açlık plazma insülini ve HOMA arasında güçlü pozitif korelasyon bulmuşlardır. Hui-Ling ve arkadaşları (2006) yaptıkları bir çalışmada tip 2 diyabetiklerdeki insülin direncinde resistinin rolünü araştırmışlardır. Çalışma sonucunda resistin ile BMI ve açlık glukozu arasında pozitif korelasyon saptamışlar ancak resistin ile açlık insülini arasında korelasyon saptayamamışlardır (Hui-Ling ve ark. 2007). Sunulan bu çalışmada da insülin miktarı STZ ile diyabet oluşturmuş grupta diğerlerinde yüksek olmasına rağmen ÇÇY verilen diyabetli grupta 2.26 ± 0.36 dan 1.95 ± 0.21 mIU/ml'ye düşmüştür. Buna paralel olarak açlık kan glukozu da 273.87 ± 12.87 mg/dl den 185.48 ± 10.2 mg/dl ye düşmüştür. ÇÇY ilavesinin incelenen parametrelerde iyileştirici etkisi bu 4 parametrede gösterildi.

Çuha çiçeği yağı omega-6 esansiyel yağ asit ve gama-linoleik asit bakımından oldukça zengindir. Streptozotosinle diyabet oluşturulan ratlarda çuha çiçeği yağı ve alfa linoleik asitin diyabette lipid parametreleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada tedavi edilen grupla tedavi edilemeyen grup karşılaştırıldığında çuha çiçeği yağı ve alfa linoleik asitin total kolesterol ($p < 0.01$),

trigliserit ($p<0.01$), düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL) ($p<0.01$) düzeylerinin anlamlı bir şekilde düşürdüğü, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL) ($p<0.05$) ve total antioksidan kapasitede ($p<0.05$) artışa neden olduğu ortaya konmuştur (Alaa Eldeen ve ark. 2011). Takahashi ve ark. (1993), 4 haftalık bir süre boyunca diyabetik hastalar arasında 4 g çuha çiçeği yağı, 2,4 g sardalya yağı ve 200 mg E vitamini uygulamasının yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) düzeylerini önemli ölçüde artırdığını ancak glisemik kontrol ve diğer etkileri olmadığını göstermiştir. Lipid profilleri; başka bir çalışmada, sıçanlarda çuha çiçeği yağı alımının toplam kolesterol düzeylerinde belirgin bir azalmaya yol açtığı bildirilmiştir (Fukushima ve ark. 2001). Geppert ve ark. (2008), Sağlıklı kadınların bir balık yağı / çuha çiçeği yağı karışımı (günde 456 mg dokosaheksaenoik asit (DHA) ve günde 353 mg GLA) ilave edilmesinin iyi tolere edildiğini ve güvenli olduğunu belirtmiştir. Deneysel diyabet oluşturulmuş ratlara çuha çiçeği yağının verilmesi açlık kan şekeri üzerine düşürücü etki yaparak, azalan HDL düzeylerine artırıcı, artan LDL, kolesterol, total lipid, VLDL ve östrojen düzeyleri üzerine ise azaltıcı yönde etki ederek diyabette oluşan lipid profilini olumlu yönde değiştirmiştir (Koç 2016). Koç (2016), çuha çiçeği yağının diyabette hem kan şekeri azaltıcı hem de oluşacak muhtemel komplikasyonları engelleyecek olumlu etkilerinin olduğu sonucuna varmışken, sunulan bu çalışmada da bulunan sonucu destekler bulgular elde edilmiştir. Gerçekten de Tablo 1 de sunulan bulgular ÇÇY'nın diyabette resistin, adiponektin insülin ve kan şekeri üzerine olumlu etki göstererek diyabetli kimselerin fitoterapötik ajan olarak rahatlıkla kullanabileceği bir madde görünümündedir.

KAYNAKLAR

- Alaa Eldeen Ahmed El-kossi , Mostafa Mahmoud Abdellah , Abeer Mohamed Rashad , Sherifa Ahmad Hamed (2011). The effectiveness of evening primrose oil and alpha lipoic acid in recovery of nerve function in diabetic rats. Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi, 2, 3, 245-253
- Barry J, Goldstein D, Wicland M (2004). Textbook of Type 2 Diabetes, 1 baskı çeviri editörü A. Cengiz Akman., Tip 2 diyabet, 5-11.
- Birch AE, Fenner GP, Watkins R, Boyd LC (2001). Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. J Agric Food Chem, 49, 4502- 4507
- Blumenthal M, Brinckmann J, Wollschlaeger B (2003). The ABC Clinical Guide to Herbs. Austin. Tex. American Botanical Council.
- Jennifer M, Moody W, Heywood JS (2001). Pollination limitation to reproductive success in the missouri evening primrose, *Oenothera Macrocarpa* (Onagraceae). Am J Bot, 88, 1615-1622.
- Fugate SE, Church CO (2004). Nonestrogen treatment modalities for vasomotor symptoms associated with menopause. Ann Pharmacother, 38, 1482-99.
- Fukushima M, Shimada K, Ohashi E, Saitoh H, Sonoyama K, Sekikawa M, Nakano M (2001). Investigation of gene expressions related to cholesterol metabolism in rats fed diets enriched in n-6 or n-3 fatty acid with cholesterol after long-term feeding using quantitative-competitive RT-PCR analysis. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 47,228-235
- Geppert J, Demmelmair H, Hornstra G, Koletzko B (2008). Cosupplementation of healthy women with fish oil and evening primrose oil increases plasma docosahexaenoic acid, gammalinolenic acid and dihomo-gamma-linolenic acid levels without reducing arachidonic acid concentrations. Br J Nutr, 99,360-369.
- Gülali Aktaş, Mustafa Şit, Hikmet Tekçe (2013). Yeni adipokinler: Leptin, Adiponektin ve Omentin, Abant Med J, 2(1), 56-62.
- Koç İ (2016). Çuha Çiçeği (*Oenothera Biennis*) Yağının Diyabetik Ratlarda Bazı Hormon ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı (Veteriner Programı) Yüksek Lisans Tezi.
- Libster M (2002). Delmar's Integrative Herb Guide for Nurses. Albany, NY: Delmar/Thomson Learning, 156-166.
- Mert N (1996). Veteriner Klinik Biyokimya, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Yayın No, 12, 232-235.
- Jamaluddin Md S, Weakley SM, Yao Q, and Chen C (2012). Resistin: functional roles and therapeutic considerations for cardiovascular disease. Br J Pharmacol, 165(3), 622-632.
- Patel L, Buckels AC, Kinghorn IJ, Murdock PR, Holbrook JD, Plumpton C (2003). Resistin is expressed in human macrophages and directly regulated by PPAR gamma activators. Biochem Biophys Res Commun, 300(2), 472-6.
- Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L (2003). Adiposederived resistin and gut-derived resistin-like moleculebeta selectively impair insulin action on glucose production. J Clin Invest, 111(2), 225-30.
- Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature, 18; 409 (6818), 307-12.
- Takahashi R, Inoue J, Ito H, Hibino H (1993). Evening primrose oil and fish oil in noninsulin-dependent-diabetes. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids , 49, 569-571
- Tokuyama Y, Osawa H, Ishizuka T, Onuma H, Matsui K, Egashira T, et al (2007). Serum resistin level is associated with insulin sensitivity in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. Metabolism, 56 (5), 693-8.
- Yorulmaz Ertuğ E, Algemi M (2017). TİP 2 diyabetli hastalarda serum resistin düzeyleri ile obezite ve insülin direnci arasındaki ilişki. Namık Kemal Tıp Dergisi, 5(3), 109 - 117



Multiple Metastases of Observed Osteosarcoma Case in A Belgian Malinois Race Female Dog

Emin KARAKURT Hilmi NUHOĞLU Serpil DAĞ Enver BEYTUT

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

Received: 09.04.2019

Accepted: 18.10.2019

ABSTRACT

In this study, we aimed to evaluate histopathologically the case of osteosarcoma detected in an Belgian Malinois race dog. The material of the study consisted of a 8.5-year-old Belgian Malinois race female dog weighing 30 kg. With the complaints of abdominal distention, difficulty in breathing, loss of appetite, fatigue, the dog brought to the Veterinary Faculty of Kafkas University Animal Hospital died on the way and was sent to the Department of Pathology for necropsy. In the follow-up, some of the tissue samples taken from the systemic necropsy animal were determined in the decalcified solution and another part in the buffered formaldehyde solution. Following routine procedures, 5 µm thick sections were taken from the prepared paraffin blocks for Hematoxylin Eosin staining. To determine the histopathological changes, the sections were examined by light microscope. In the light of the histopathological findings, osteosarcoma was diagnosed in the brain and lung metastatic foci.

Keywords: *Histopathology, Dog, Metastasis, Osteosarcoma*

öz

Belçika Malinois Irkı Dişi Bir Köpekte Gözlenen Osteosarkom Vakasına Ait Çoklu Metastazlar

Bu çalışmamızda, Belçika Malinois ırkı bir köpekte saptanan osteosarkom vakasının histopatolojik açıdan değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın materyalini 8.5 yaşında 30 kg ağırlığında Belçika Malinois ırkı dişi bir köpek oluşturdu. Abdominal şişkinlik, solunum güçlüğü, iştahsızlık, halsizlik şikâyetleri ile Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan hastanesine getirilen köpek yolda ölmüş ve nekropsisi yapılmak üzere Patoloji Anabilim Dalına gönderilmiştir. Takibinde sistemik nekropsisi gerçekleştirilen hayvandan alınan doku örneklerinin bir kısmı dekalsifiye solüsyonunda diğer bir kısmı ise tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Rutin işlemlerin ardından hazırlanan parafin bloklardan, Hematoksilen Eozin boyaması için 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik değişikliklerin belirlenmesi amacıyla kesitler ışık mikroskopunda incelendi. Elde edilen histopatolojik bulgular ışığında beyin ve akciğerdeki metastatik odaklara osteosarkom tanısı konuldu.

Anahtar Kelimeler: *Histopatoloji, Köpek, Metastaz, Osteosarkom*

INTRODUCTION

Osteosarcoma is the most common primary bone tumor in dogs (Wehrle-Martinez et al. 2016). It constitutes 85% of skeletal malignancies and 4% of all malignancies in dogs (Wolfesberger et al. 2006; Milanta et al. 2012). This tumor with mesenchymal origin has very aggressive effects locally; It causes lysis or bone production; or causes both of these (McNeill et al. 2007; Petty et al. 2008). Metastasis is very common, continues usually subclinically and occurs early in tumor formation (Ohta et al. 2004; Fan et al. 2008; Shoeman et al. 2012). Even osteosarcomas originating from long bones can metastasize to the lung even in the early period when the diagnosis of primary tumor cannot

be established (Sagartz et al. 1996). Lung metastasis occurs by hematogenous route and has been seen in 90% of all cases (Fieten et al. 2009; Piskun et al. 2011). Most of the dogs die due to lung metastasis (Gebhard et al. 2016). The prognosis of osteosarcoma is very poor, the recurrence rate is quite high; and less than 20% of the affected dogs do not live for more than 2 years (Wilson et al. 2008; Leonardo et al. 2018; Withers et al. 2019). Osteosarcoma is frequently observed in middle or old, male and large race dogs (Kirpensteijn et al. 2002; Hoenerhoff et al. 2004; Mullins et al. 2004; Selvarajah et al. 2012). Osteosarcomas are seen in high rate in races such as especially Doberman Pinscher, Golden Retriever, Great Dane, German Shepherd, St Bernard, Irish Setter, Boxer,

Rottweiler and Greyhound (McNeill et al. 2007; Cristo et al. 2017). 20-25% of skeletal osteosarcomas in dogs are caused by axial skeletal bones. Approximately 50% of these cases have axial skeletal osteosarcoma in head and in the other 50%; ribs, vertebrae and pelvis. Osteosarcoma observed in the head region is a rare tumor that is localized in the mandibula maxilla, skull and paranasal sinuses in dogs. The appendix skeleton is affected 3 to 4 times more than the axial skeleton (Nagamine et al. 2015; Murphy et al. 2017). Osteosarcoma is usually occurs in the metaphyseal region of the long bones (Sanches et al. 2009). The proximal humerus, distal radius, distal femur, proximal and distal tibia are the most common sites of appendicular osteosarcoma (Hoenerhoff et al. 2004). Amputation and chemotherapy are the best treatment options; untreated lesions; It has a tendency to progress rapidly and causes lameness and pathological fractures (Farese et al. 2004).

In this study, we aimed to evaluate histopathologically the case of osteosarcoma detected in a Belgian Malinois race dog.

CASE HISTORY

The material of the study consisted of an 8.5-year-old Belgian Malinois race female dog weighing 30 kg. With the complaints of abdominal distension, difficulty in breathing, loss of appetite and fatigue, the dog who was brought to the Veterinary Faculty Animal Hospital of Kafkas University died on the way and was sent to the Department of Pathology for necropsy.

In the follow-up, some of the tissue samples taken from the systemic necropsy animal were determined in decalcified solution and another part was detected in buffered formaldehyde solution. Following the routine procedures, 5 µm thick sections were taken from the paraffin blocks prepared for Hematoxylin&Eosin staining. To determine the histopathological changes, the sections were examined by light microscope. At the lower left part of the mandible, a mass of 4*4*3 cm fluctuated content was found. It was observed that the torsion around the long axis of the stomach was excessive and tympanic. Growing up in the spleen was seen. The examination of the intestine revealed that jejunum was hyperemic. The lungs were hyperemic and hard structures with a size of 1-3 mm were found in the parenchyma (Figure 1).

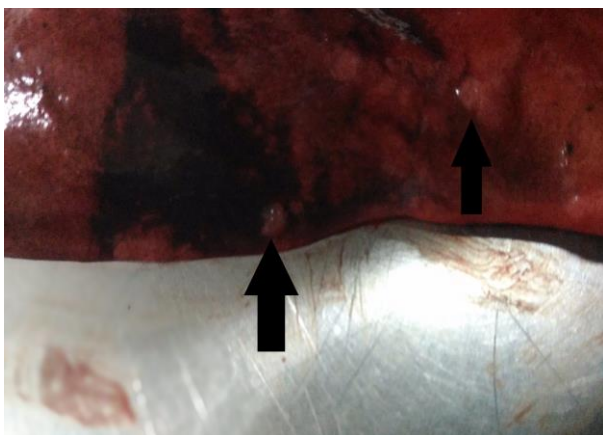


Figure 1. Lung tissue, hard structures with a size of 1-3 mm in the parenchyma (arrows)

The presence of white foci in the meninges was observed (Figure 2). The liver was mildly icteric. No other macroscopic findings were observed in the other organs and they showed normal anatomical structure. Although

the lung and brain metastasis sites were observed, primary tumor focus (anterior and posterior extremities, ribs and skull bones) could not be detected despite the detailed examinations.

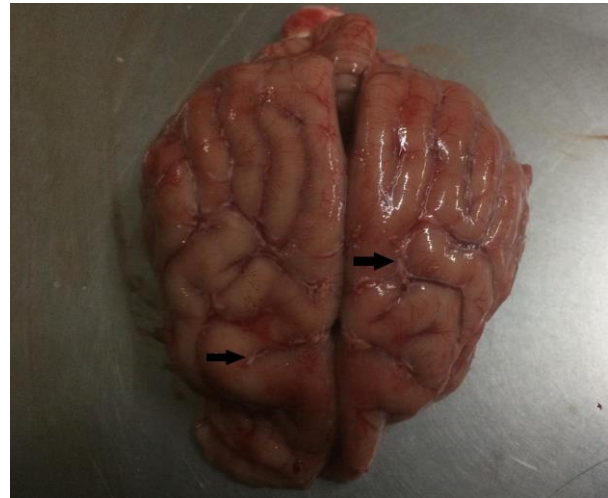


Figure 2. Brain tissue, white foci in meninges (arrows)

Histopathological examination of tissue samples taken; degeneration of neurons, gliosis and osteosarcoma metastasis areas were observed in the brain. Dilatation of the sinusoids, dissociation in the remark cords, bilirubin pigment were common in hepatocytes. Hyperemia, atelectatic areas, spillage in bronchial and bronchiolar epithelium and anthracosis were observed in the lungs. Osteosarcoma metastasis sites were detected in the regions near the lung serosal surface (Figure 3).

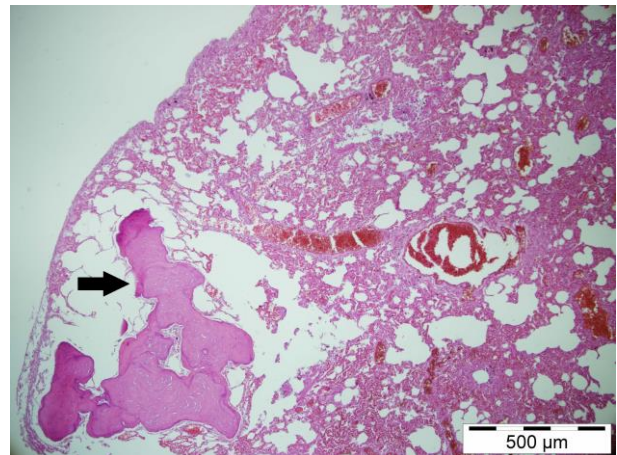


Figure 3. Lung tissue, metastatic area (arrow), 500 µm , H&E

Purple-pink metastatic areas were found in the brain, similar to the foci in the lungs (Figure 4-5). Haemorrhagic areas of the spleen were found. Severe hyperemia in the jejunum, spillage in the mucosa epithelium and mononuclear cell infiltration in the lamina propria were determined.

Connective tissue increase in renal interstitium; hyaline cylinders in tubules; atrophy in glomeruli; edema fluid in the bowman capsule, andd chronic nonpurulent nephritis was detected. In the upper 1/3 of the lamina propria in the stomach lamina epithelials, necrosis was lost in severe hyperemia, mucosa and gland epithelium. It was determined that the mass taken under the mandible was cystic dilatation covered by a very folded epithelium. No histopathological findings were observed in the other organs and normal histological structure was observed.

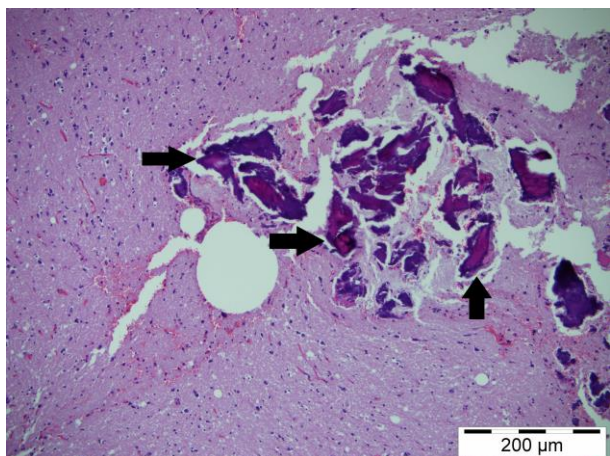


Figure 4. Brain tissue (not decalcified), metastatic foci (arrows), 200 μ m, H&E

DISCUSSION and CONCLUSION

Osteosarcoma is often observed in males and large race dogs (Kirpensteijn et al. 2002; Hoenerhoff et al. 2004; Mullins et al. 2004; Selvarajah et al. 2012). The average age of the tumor is 7-8 years. Osteosarcomas in races such as Doberman, Pinscher, Golden Retriever, Great Dane, German Shepherd, St. Bernard, Irish Setter, Boxer, Rottweiler and Greyhounds are highly prevalent (McNeill et al. 2007; Cristo et al. 2017). There are only 5 studies in the Belgian Malinois in the diagnosis of osteosarcoma (Peterson et al. 2000; Selvarajah et al. 2009; Sivacolundhu et al. 2013, Moore et al. 2000, Pagano et al. 2016). In this study, we observed that a female dog of males having a males age of 8.5 years old with a weight of 30 kg was observed. The gender of the dog is different from the literature data indicating that this tumor is usually in male dogs. In this study, we observed that the osteosarcoma was detected in an 8.5-year-old-age Belgium Malinois race female dog weighing 30 kg; Although the age range and race data are consistent with the literature, being female of the dog is different from the literature data indicating that this tumor is usually in male dogs.

Osteosarcoma usually occurs in the metaphyseal region of the long bones (Sanches et al. 2009). The proximal humerus, distal radius, distal femur, proximal and distal tibia are the most common sites of appendicular osteosarcoma (Hoenerhoff et al. 2004). Cases originating from long bones in dogs usually cause lung, regional lymph nodes, liver and kidney organs (Kutsal et al. 2003; Murphy et al. 2017; Thompson and Dittmer 2017). It has rarely been reported to metastasize to the central nervous system, especially to the brain tissue (McNeill et al. 2007; Pazzi et al. 2013; Cristo et al. 2017). In our study, although there were metastases in the lung and brain similar to the literature data; In spite of the detailed examinations, primary tumor focus (anterior and posterior extremities, ribs and skull bones) could not be detected.

Based on the histopathological findings, osteosarcoma was diagnosed in the metastatic foci of the brain and lung tissue. In the literature search, it was observed that there were very few cases of osteosarcoma observed in the Belgian Malinois race. In addition, the material of the study material animal is female and the presence of metastatic foci in the brain, except for the lung tissue, makes the findings even more remarkable. Cerebral metastases of osteosarcoma cases observed in dogs are very rare and there are few literature studies on the subject. In Belgium

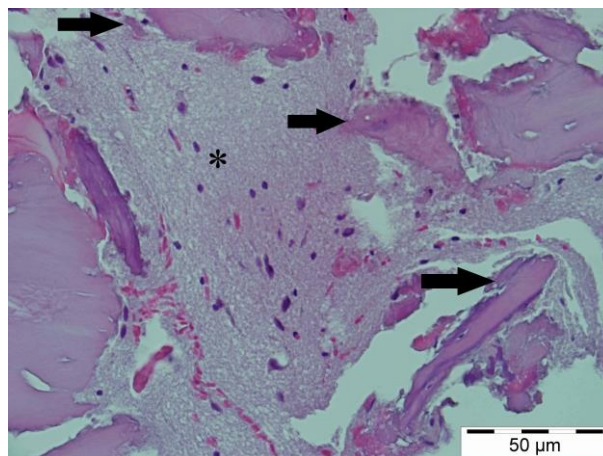


Figure 5. Brain tissue (decalcified), * means brain tissue, trabecular structures (arrows), 50 μ m, H&E

Malinois race dog, it is the first osteosarcoma study in which brain metastases have been shown. It is thought that this case report will make a significant contribution to the literature data.

REFERENCES

- Cristo TG, Vargas CB, Biezu G, Costa LS, Dal Pont TP, Kanamura CT, Salbego FZ, Traverso SD, Casagrande RA (2017). Metastatic osteosarcoma as a cause of hemorrhagic stroke in a dog. *Braz J Vet Pathol*, 10 (3), 105-110.
- Fan TM, Barger AM, Sprandel IT, Fredrickson RL (2008). Investigating TrkA expression in canine appendicular osteosarcoma. *J Vet Intern Med*, 22 (5), 1181-1188.
- Farese JP, Ashton J, Milner R, Ambrose LL, Van Gilder J (2004). The effect of the bisphosphonate alendronate on viability of canine osteosarcoma cells in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 40 (3-4), 113-117.
- Fieten H, Spee B, Ijzer J, Kik MJ, Penning LC, Kirpensteijn J (2009). Expression of hepatocyte growth factor and the proto-oncogenic receptor c-Met in canine osteosarcoma. *Vet Pathol*, 46 (5), 869-877.
- Gebhard C, Fuchs-Baumgartinger A, Razzazi-Fazeli E, Miller I, Walter I (2016). Distribution and activity levels of matrix metalloproteinase 2 and 9 in canine and feline osteosarcoma. *Can J Vet Res*, 80 (1), 66-73.
- Hoenerhoff MJ, Kiupel M, Rosenstein D, Pool RR (2004). Multipotential Osteosarcoma with Various Mesenchymal Differentiations in a Young Dog. *Vet Pathol*, 41 (3), 264-268.
- Kirpensteijn J, Timmermans-Sprang EP, van Garderen E, Rutteman GR, Lantinga-van Leeuwen IS, Mol JA (2002). Growth hormone gene expression in canine normal growth plates and spontaneous osteosarcoma. *Mol Cell Endocrinol*, 197 (1-2), 179-185.
- Kutsal O, Kaya Ü, Vural S, Sağlam M (2003). Köpek ve Kedilerde 1986-2000 Yılları Arasında Ankara'da İncelenen Kemik Tümörleri. *Türk J Vet Anim Sci*, 27: 109-115.
- Leonardo L, Laura P, Serena BM (2018). miR-1 and miR-133b expression in canine osteosarcoma. *Res Vet Sci*, 117:133-137.
- McNeill CJ, Overley B, Shofer FS, Kent MS, Clifford CA, Samluk M, Haney S, Van Winkle TJ, Sorenmo KU (2007). Characterization of the biological behaviour of appendicular osteosarcoma in Rottweilers and a comparison with other breeds: a review of 258 dogs. *Vet Comp Oncol*, 5 (2), 90-98.
- Millanta F, Asproni P, Cancedda S, Vignoli M, Bacci B, Poli A (2012). Immunohistochemical expression of COX-2, mPGES and EP2 receptor in normal and reactive canine bone and in canine osteosarcoma. *J Comp Pathol*, 147 (2-3), 153-160.
- Moore GE, Mathey WS, Eggers JS, Estep JS (2000). Osteosarcoma in adjacent lumbar vertebrae in a dog. *J Am Vet Med Assoc*, 217 (7), 1038-1040.
- Mullins MN, Lana SE, Dernell WS, Ogilvie GK, Withrow SJ, Ehrhart EJ (2004). Cyclooxygenase-2 expression in canine appendicular osteosarcomas. *J Vet Intern Med*, 18 (6), 859-865.
- Murphy BG, Mok MY, York D, Rebhun R, Woolard KD, Hillman C, Dickinson P, Skorupski K (2017). Evaluation of P16 expression in canine appendicular osteosarcoma. *BMC Veterinary Research*, 13 (1), 189.

- Nagamine E, Hirayama K, Matsuda K, Okamoto M, Ohmachi T, Kadosawa T, Taniyama H (2015). Diversity of Histologic Patterns and Expression of Cytoskeletal Proteins in Canine Skeletal Osteosarcoma. *Vet Pathol*, 52 (5), 977-984.
- Ohta G, Sakai H, Kachi S, Hirata A, Yonemaru K, Kitajima A, Yanai T, Masegi T (2004). Assessment of proliferative potentials of canine osteosarcomas and chondrosarcomas by MIB-1 immunohistochemistry and bromodeoxyuridine incorporation. *J Comp Pathol*, 131 (1), 18-27.
- Pagano C, Boudreaux B, Shiomitsu K (2016). Safety And Toxicity Of An Accelerated Coarsely Fractionated Radiation Protocol For Treatment Of Appendicular Osteosarcoma In 14 Dogs: 10 Gy × 2 Fractions. *Vet Radiol Ultrasound*, 57 (5), 551-556.
- Pazzi P, Tompkins S, Kirberger RM (2013). Canine spirocercosis-associated extraskelatal osteosarcoma with central nervous system metastasis. *J S Afr Vet Assoc*, 84(1), E1-4.
- Peterson MR, Frommelt RA, Dunn DG (2000). A study of the lifetime occurrence of neoplasia and breed differences in a cohort of German Shepherd Dogs and Belgian Malinois military working dogs that died in 1992. *J Vet Intern Med*, 14 (2), 140-145.
- Petty JC, Lana SE, Thamm DH, Charles JB, Bachand AM, Bush JM, Ehrhart EJ (2008). *Vet Comp Oncol*, 6 (2), 133-140.
- Piskun CM, Muthuswamy A, Huelsmeyer MK, Thompson V, Stein TJ (2011). Wnt/ β -catenin expression does not correlate with serum alkaline phosphatase concentration in canine osteosarcoma patients. *PLoS One*, 6 (10), e26106.
- Sagartz JE, Bodley WL, Gamblin RM, Couto CG, Tierney LA, Capen CC (1996). p53 tumor suppressor protein overexpression in osteogenic tumors of dogs. *Vet Pathol*, 33 (2), 213-221.
- Sanches DS, Pires CG, Fukumasu H, Cogliati B, Matsuzaki P, Chaible LM, Torres LN, Ferrigno CR, Dagli ML (2009). Expression of connexins in normal and neoplastic canine bone tissue. *Vet Pathol*, 46 (5), 846-859.
- Selvarajah GT, Verheije MH, Kik M, Slob A, Rottier PJ, Mol JA, Kirpensteijn J (2012). Expression of epidermal growth factor receptor in canine osteosarcoma: association with clinicopathological parameters and prognosis. *Vet J*, 193 (2), 412-419.
- Shoeneman JK, Ehrhart EJ, Eickhoff JC, Charles JB, Powers BE, Thamm DH (2012). Expression and function of survivin in canine osteosarcoma. *Cancer Res*, 72 (1), 249-259.
- Sivacolundhu RK, Runge JJ, Donovan TA, Barber LG, Saba CF, Clifford CA, de Lorimier LP, Atwater SW, DiBernardi L, Freeman KP, Bergman PJ (2013). Ulnar osteosarcoma in dogs: 30 cases (1992-2008). *J Am Vet Med Assoc*, 243 (1), 96-101.
- Thompson KG, Dittmer KE (2017). Tumors of Bone. In: *Tumors of Domestic Animals*, Moulton JE (Ed), 356-424, Wiley Blackwell, Iowa.
- Wehrle-Martinez AS, Dittmer KE, Aberdein D, Thompson KG (2016). Osteocalcin and Osteonectin Expression in Canine Osteosarcoma. *Vet Pathol*, 53 (4), 781-787.
- Wilson H, Huelsmeyer M, Chun R, Young KM, Friedrichs K, Argyle DJ (2008). Isolation and characterisation of cancer stem cells from canine osteosarcoma. *Vet J*, 175 (1), 69-75.
- Withers SS, Skorupski KA, York D, Choi JW, Woolard KD, Laufer-Amorim R, Sparger EE, Rodriguez CO, McSorley SJ, Monjazebe AM, Murphy WJ, Canter RJ, Rebhun RB (2019). Association of macrophage and lymphocyte infiltration with outcome in canine osteosarcoma. *Vet Comp Oncol*, 17 (1), 49-60.
- Wolfesberger B, Walter I, Hoelzl C, Thalhammer JG, Egerbacher M (2006). Antineoplastic effect of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on canine osteosarcoma cells. *Res Vet Sci*, 80 (3), 308-316.



VAN VETERINARY JOURNAL



Article Copyright Transfer Agreement Form

We, the undersigned researchers, certify that; the article we have sent; is original, wasn't sent to or disapproved of potential publication by any other journal, wasn't initially published, and we bear the responsibility concerning the Scientific content and Ethical values related to the article, and transfer any kind and form of copyright related to the Article to Van Veterinary Journal since it is published in the journal, and accept that we will not make any changes wholly or partly in the article and chose as the authorized researcher.

Title of the article:

.....
.....
.....

Authors Name	Date	Signature
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		

Authorized Researcher

Title, Name-Surname :

Full Address :

e- mail :

Tel, Fax :

Date and Signature :



Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is Van Vet J.
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication.
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://vanvetderg.org> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures and graphs; original papers and reviews should not exceed 15 pages and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 1000 words. Summary should include **Aim, Material and Method, Results and Conclusion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system.
- 9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.
- 10- **Copyright Transfer Agreement Form** which automatically sends to the authors by the submission system after acceptance of the Paper should be signed and posted to the Editorial Office of the journal.
- 11- Apart from tables and graphs all visual elements (Photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **figure**. Tables and graphs are named as it is.
- 12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish and English** in the text.
- 13- Original research articles should be lined up as; **English Heading, Author(s) name, author(s) address, Summary and key words** and then **Turkish heading, summary and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgement or information** (if there is) and **References**.
- 14- References should be listed according to authors surname alphabetically. In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the [Web of Science](#). For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:
Articles:
Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015). Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.
Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015). Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989
Books:
Marrow DA (1986). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
Books chapters:
Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and Listeria monocytogenes. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.
Electronic Material: The name of the article and available web address and access date should be written.
Who (2006). Avian Influenza, February 2006, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ Access date: 10 January 2009.
- 15- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>).
- 16- Information about the publication expenses for accepted papers will be given to the author(s) after determining cost.
- 17- Copyright fee will not be paid to the author(s).

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

Yuzuncu Yil Universitesi, Veteriner Fakultesi, Dergi Editorlugu, 65080-Kampus/Van/TURKEY
e-mail: vfd@yyu.edu.tr Phone: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 432 225 11 27