



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2020, 13(1), March



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

<https://dergipark.org.tr/kvj>

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

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

Editor in Chief

Assoc. Prof. Dr. Zeki GÜRLER

Editors

Assoc. Prof. Dr. Recep KARA
Assoc. Prof. Dr. Deniz YENİ

Section Editors

Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM
Prof. Dr. Kerem URAL
Prof. Dr. Sadullah BAHAR
Prof. Dr. Akın YAKAN
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN

Foreing Language Editor

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN
Assist. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

Statistics Editors

Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ
Assist. Prof. Dr. İlky DOĞAN

Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN
Assoc. Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK
Dr. Eyüp Eren GÜLTEPE
Dr. Barış DENK

Prof. Dr. Arif Altuntaş

Prof. Dr. Atilla Şimşek

Prof. Dr. Cevdet Uğuz

Prof. Dr. Yavuz O. Birdane

Prof. Dr. İbrahim Demirkan

Prof. Dr. İlhami Çelik

Prof. Dr. İsmail Bayram

Prof. Dr. Abdullah Kaya

Prof. Dr. Mustafa Alisharlı

Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir

Prof. Dr. Recep Aslan

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

Prof. Dr. Zafer Karaer

Prof. Dr. Zehra Bozkurt

Prof. Dr. İbrahim Taşal

Prof. Dr. Şule Kaya

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Prof. Dr. Aysun Demirkan

Prof. Dr. Hasan Çiçek

Prof. Dr. Fatih M. Birdane

Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak

Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç

Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt

Ankara University -Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ondokuz Mayıs University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ankara University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

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

Kocatepe Veterinary Journal;

indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Dizin, Turkey Citation Index, CAB Abstract, ResearchBib, SIS (Scientific Indexing Services), CiteFactor, CrossRef, Index Copernicus, Google Scholar, SJIFactor

Addressed:

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

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

www.kvj.aku.edu.tr

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

Only accepts online submission

RESEARCH ARTICLES

Effect of White Mulberry Extract on Performance, Anti-inflammatory and Serum Antioxidant Parameters in Diabetes-induced Rats with Streptozotocin (<i>Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Ratlarda Beyaz Dut Ekstraktının Performans, Antiinflamatuvar ve Serum Antioksidan Parametreleri Üzerine Etkisi</i>) Zekeriya Safa İNANÇ, Harun KARACA, Volkan İPEK, Burcu Menekşe BALKAN, Orhan ÇORUM, Şükrü GÜNGÖR, Muhammed İNANÇ, Halit İMİK, Ayhan ATA	1-10
Comparison of Effects of Administration of Oral or Topical Boron on Wound Healing and Oxidative Stress in Rats (<i>Ratlarda Oral veya Topikal Olarak Uygulanan Borun Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması</i>) Meral KONCA, Musa KORKMAZ	11-18
Investigation of Listeria spp. in Raw Cow and Water Buffalo Milks Sold in Sivas Province (<i>Sivas İlinde Satılan Çiğ İnek ve Manda Sütlerinde Listeria spp. Varlığının Araştırılması</i>) Seyda ŞAHİN, Abdullah AYYILDIZ	19-24
Determination The Levels of Some Biochemical Parameters in Female Hair Goats in Cukurova Region (<i>Çukurova Yöresi Dişi Kıl Keçilerinde Bazı Biyokimyasal Parametre Düzeylerinin Belirlenmesi</i>) Cenk ER, Mahmut OK	25-29
Some Quality Properties of Malt Vinegars Produced with Different Germination Periods (<i>Farklı Çimlendirme Süreleriyle Üretilen Malt Sirkelerin Bazı Kalite Özellikleri</i>) Oktay TOMAR, Gökhan AKARCA, Abdullah ÇAĞLAR	30-37
Determination of The Effects of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid on Hematological Parameters in Rats Given Alcohol (<i>Alkol Verilen Sıçanlarda 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asitin Hematolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi</i>) Mehmet BAŞEĞMEZ, Muhammed ETYEMEZ, İbrahim DURMUŞ, Abdullah ERYAVUZ	38-44
First Molecular Characterization of Posthodiplostomum cuticola (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metacercariae Infecting the Gills of Chubs (Squalius cephalus) in Turkey (<i>Türkiye'de Tath Su Kefali'nin (Squalius cephalus) Solungaçlarını Enfekte Eden Posthodiplostomum cuticola (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metaserkerlerinin İlk Moleküler Karakterizasyonu</i>) Emrah SİMSEK, Alparslan YİLDİRİM, Abdullah İNCİ, Onder DUZLU, Erdal YILMAZ, Zuhul ONDER, Arif CİLOĞLU, Gokmen Zafer PEKMEZCİ	45-51
Hand Hygiene Profile of Food Handlers in Canteens of Erciyes University Campus (<i>Erciyes Üniversitesi Kampüsündeki Kantin Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi</i>) Onur ÇATAR, Yeliz YILDIRIM	52-59
The Effect of Temperature on Angiogenesis in Chicken Embryos (<i>Tavuk Embriyolarında Sıcaklığın Anjiyogenez Üzerine Etkisi</i>) Emre ATAY, Seval AYEKİN, Rabia Zülal HATİPOĞLU, Münevver Ceyda KURAL, Mert KUSEYRİ, Yavuz TAÇYILDIZ, Yusuf BAŞOĞLU, Ali Batuhan ALKAN, Abdülkadir BİLİR, Tolga ERTEKİN	60-68
Meta-analysis of Prevalence of Cronobacter sakazakii in Foods Consumed in Turkey (<i>Türkiye'de Tüketime Sunulan Gıdalarda Cronobacter sakazakii Prevalansların Meta-analiz ile Belirlenmesi</i>) Serhat AL, Adalet DIŞHAN, Elif ÇELİK, Aytaç AKÇAY	69-76
Expression Patterns of Galectin-1 and Galectin-3 in Hibernating Anatolian Ground Squirrel (Spermophilus Xanthoprimum) Gastrointestinal Tract (<i>Hibernasyondaki Anadolu Yer Sincabı (Spermophilus xanthoprimum) Gastrointestinal Kanalında Galektin-1 ve Galektin-3'ün Ekspresyon Paternleri</i>) Mehmet ÖZBEK, Mustafa ÖZTOP	77-85
Caspases Activities in TNF-α Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell (<i>TNF-a Uygulanan HepG2 Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde Kaspaç Aktiviteleri</i>) Burcu Menekşe BALKAN, Ögünç MERAL, Görkem KISMALI, Deniz TURAN, Tevhide SEL	86-91
The Effects of Suckling and Artificially Providing Colostrum (Varying Amount) on The Passive Immunity of Newborn Calves (<i>Yeni Doğan Buzağuların Kolostrumu Emerek ve Suni Yollarla Değişik Oranlarda Verilmesinin Pasif İmmünite Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması</i>) Mehmet DÜZER, Abuzer ACAR	92-97

Effect of White Mulberry Extract on Performance, Anti-inflammatory and Serum Antioxidant Parameters in Diabetes-induced Rats with Streptozotocin

Zekeriya Safa İNANÇ^{1*}, Harun KARACA², Volkan İPEK³, Burcu Menekşe BALKAN⁴, Orhan ÇORUM⁵, Şükrü GÜNGÖR², Muhammed Enes İNANÇ², Halit İMİK¹, Ayhan ATA²

¹Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Atatürk, 25240, Erzurum, Turkey

²Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mehmet Akif Ersoy, 15030, Burdur, Turkey

³Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mehmet Akif Ersoy, 15030, Burdur, Turkey

⁴Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Mehmet Akif Ersoy, 15030, Burdur, Turkey

⁵Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Kastamonu, 37200, Kastamonu, Turkey

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effect of the white mulberry extract on histopathology, anti-inflammatory properties of liver tissue, blood serum antioxidant parameters and performance parameters of diabetes-induced rats with streptozotocin. Experimental groups consist of 24 animals which were divided into four groups; control group (C, n: 5), streptozotocin applied group 1 (DG 1, n: 6), mulberry extract applied group 2 (DG 2, n: 7), streptozotocin and mulberry extract experimental group 3 (DG 3, n:6), totally 24 animals were used. Although vascular congestion in the liver tissue was detected 2 animals in C and DG 2 groups and 1 animal in DG 3 group, vascular congestion was detected in all animals in DG 1 group. (P <0.05). Inflammatory findings of liver tissue were not seen in C, whereas it was mild in 2 animals in DG 2 and it was seen in all animals in the group of DG 1. Degeneration findings in liver tissue were not seen in C, but it was detected in 1 animal of DG 2 and all animals in DG 1 (P <0.01). There was no statistical difference between the ceruloplasmin levels of the groups (P > 0.05). Live weight gain in control group 150,03 g., DG 2 114.43 g. (P <0,01). 1.33 g. live weight gain and weight loss in DG 3 (P > 0.05). In conclusion, mulberry extract applied to rats significantly reduced vascular congestion, inflammation and degeneration findings in liver tissue and it can be said that mulberry extract has antiinflammatory effect.

Keywords: Anti-inflammatory, Antioxidant, Inflammation, Performance, White Mulberry Extract.

Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Ratlarda Beyaz Dut Ekstraktının Performans, Antienflamatuar ve Serum Antioksidan Parametreleri Üzerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışmada streptozotosin uygulanarak diyabet oluşturulan ratlarda beyaz dut ekstraktının kan serumlarında antioksidan etkileri, karaciğer dokusu histopatoloji, antienflamatuar özelliği ve ratlarda performans parametreleri üzerine etkisi araştırıldı. Deney grupları, kontrol grubu (K, n:5), streptozotosin uygulanan deney grubu 1 (DG 1, n:6), dut ekstraktı uygulanan deney grubu 2 (DG 2, n:7), streptozotosin ve dut ekstraktının birlikte uygulandığı deney grubu 3 (DG 3, n:6) olmak üzere toplam 24 adet hayvandan oluşturuldu. Karaciğer dokusunun yapısındaki vasküler konjesyon K ve DG 2'de 2 hayvanda, DG 3'te 1 hayvanda tespit edilmesine rağmen, DG 1'de bütün hayvanlarda belirlenmiştir (P<0,05). Karaciğer dokusunun yangı bulguları K'da görülmezken, DG 2'de 2 adet hayvanda hafif şekilde, DG 1'deki tüm hayvanlarda gözlenmiştir. Karaciğer dokusundaki dejenerasyon kontrol grubunda görülmezken, DG 2'de 1 adet, DG 1'de ise tüm hayvanlarda görülmüştür (P<0,01). Grupların serum dokularındaki seruloplazmin düzeyleri arasında önemli bir fark bulunmazken (P>0,05), Paraoksonaz (PON) aktiviteleri arasındaki fark önemli düzeyde olduğu tespit edilmiştir (P<0,05). Canlı ağırlık artışı kontrol grubunda 150,03 g., DG 2 de 114,93g. olarak gerçekleşmiştir (P<0,01). DG 1'de deneme süresince 1.33 g. canlı ağırlık artışı olurken DG 3'te ağırlık kaybı olmuştur (P>0,05). Sonuç olarak çalışmada ratlara uygulanan dut ekstraktının karaciğer dokusunda vasküler konjesyon, yangı ve dejenerasyon olgularını önemli derecelerde azalttığı ve antienflamatuar etkisi gösterebileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Antienflamatuar, Antioksidan, Beyaz dut ekstraktı, Performans, Yangı

To cite this article: İnanç Z.S., Karaca H., İpek V., Balkan B.M., Çorum O., Güngör Ş., İnanç M. E., İmik H., Ata A. Effect of White Mulberry Extract on Performance, Anti-inflammatory and Serum Antioxidant Parameters in Diabetes-induced Rats with Streptozotocin. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):1-10.

Submission: 06.11.2019 Accepted: 24.11.2019 Published Online: 21.01.2020

ORCID ID; ZSİ: 0000-0003-0832-9209, HK: 0000-0002-1076-8625, Vİ: 0000-0001-5874-7797,

BMB: 0000-0002-0206-6455, OÇ: 0000-0003-3168-2510, ŞG: 0000-0003-3460-522X, MEİ: 0000-0001-6954-6309,

Hİ: 0000-0001-6933-2124, AA: 0000-0003-0590-5995

*Corresponding author e-mail: vet.zsinanc@gmail.com

GİRİŞ

Günümüzde deney hayvanları birçok amaç için kullanılmaktadır. Bunun en önemli nedeni deney hayvanlarının çok hızlı ve kısa sürede üremesi, gelişmesi ve ekonomik olmasıdır. Ayrıca, ratların metabolizmalarının diğer hayvanlara göre insan metabolizmasına daha yakın olması sayılabilir. Hastalıklarla mücadeleyi geliştirmek ve yönetmek için yeni ilaçlar ve etken maddeler üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Beyaz dut bitkisi (*Morus Alba*) gıda, ilaç, kozmetik ve hayvancılık sektöründe özellikle ipek böceği beslenmesinde (yaprakları) yaygın olarak kullanılmaktadır (Başkaya 2013).

Canlılar strese maruz kaldıklarında doku hücrelerinde çeşitli hasarlar oluşabilmektedir. Hücrelerde oluşan hasarın derecesi, stresi yapan etkenin kendisi ve dozuna bağlı olarak değişmektedir. Streptozotosin'in (STZ) hayvanların başta pankreas ve karaciğer olmak üzere çeşitli dokusunda hasar oluşturduğu bilinmektedir (Yaman ve Doğan 2016).

Seruloplazmin (SP) büyük oranda karaciğerde sentezlenen, bakırın taşınmasında ve vücutta oluşan oksidatif serbest radikallerin uzaklaştırılmasında önemli görevleri olan bir proteindir. SP, dokularda oluşan hasarları asgariye indirmek için antioksidan ve sitoprotektif özellikler gösteren akut faz bir proteindir (Fox ve ark. 1995, Mcpearson 1996). Bu protein aynı zamanda oksidaz enzimi özelliğinde olduğu için (Balakrishnan ve Goswami 1991, Fleming ve ark. 1991) demir metabolizmasında da önemli görevleri bulunmaktadır. Ayrıca hücre dışında diğer antioksidanlar (E ve C vitamini ile albumin, bilirubin, haptoglobulin, beta-karoten ve alfa-I antitripsin, transferrin) ile birlikte savunma sisteminde görev alır (Halliwell 1991). Paraoksonaz enzimi (PON) karaciğerde sentezlenmesine rağmen karaciğer, böbrek, ince bağırsak başta olmak üzere birçok dokuda ve plazmada bulunur. Bu enzimin en önemli görevi hidrojen peroksit radikallerini organizmadan uzaklaştırmak ve yağ asitlerini oksidasyondan korumaktır (Ali ve ark. 2003).

Dünyada tropikal ve subtropikal iklimlere sahip sıcak bölgelerde yetiştirilen beyaz dut bitkisi (*Morus Alba*) birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Bu bitkinin meyvesi değişik formatlarda gıda ve tıbbi sektöründe, yaprakları ise ipek böceği yetiştiriciliğinin yem maddesi olarak geniş alanda kullanılmaktadır. Günümüzde doğal olmayan bazı katkı maddelerinin kullanımına bağlı olarak hastalıkların arttığı ve bu durum ise insanların doğal ürünleri tüketimine yönelmesine neden olmuştur. Ayrıca günümüzde buna paralel olarak, özellikle tıbbi sektörde doğal ürünlerin kullanım alanı artmıştır. Dut meyvesinin yapısında bulunan [alkaloidler, flavonoidler (Du ve ark 2003), glikozitler (Katsube ve ark 2006, Wang ve ark 2011), terpenoidler (Kikuchi ve ark 2010),

steroidler (Kuo ve ark 1970), uçucu yağlar, tanenler (Banfield 1951)] maddelerin antidiyabetik (Singab ve ark 2005), hipolipidemik, antihipertansif (Lee ve ark 2011), antimikrobiyal (Kim ve ark 1993), antioksidan (Arabshahi-Delouee ve Urooj 2007, Wattanapitayakul ve ark 2005), antiteratosklerotik (Enkhmaa ve ark 2005), antikanser (Choi ve Hwang 2005), nöroprotektif (Niidome ve ark 2007) ve antiülser (Ameen ve ark 2009) etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma streptozotosin (STZ) ile diyabet oluşturulan ratların karaciğer doku ve kan serum örneklerinde analizler yapılmıştır. Yapılan literatür taramasında dut ekstraktı uygulamasının STZ ile indüklenen diyabet modelinde etkinliği hakkında herhangi bilgi bulunmamıştır. Hayvanlar diyabet olduklarında pankreas dokusunun hasar görmesi sonucu insülin metabolizmasının bozulduğu bilinmektedir. Bu çalışmanın yapılma amacı, STZ ve dut ekstraktı uygulamasının karaciğer dokusunun histopatolojisi, performans parametreleri ve serumlarında antioksidan parametreleri üzerine etkilerini araştırmaktır.

MATERYAL ve METOT

Hayvan ve Yem Materyali, Bakımı ve Beslenmesi

Bu çalışma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nde 15.05.2019 tarih 522 sayılı etik kurul izni ile yapıldı. Deneyde ortalama 8 haftalık yaşta 24 adet erkek Wistar Albino ırkı rat kullanıldı. Deneme başında ratların ortalama canlı ağırlıkları Hayvanlara günlük 12 saat ışık ve 12 saat karanlık olacak şekilde, yaklaşık 20±2°C sıcaklık ve nem oranı %45-65 olan bir ortam sağlandı. Hayvanlara verilecek olan rasyon özel bir yem fabrikasından temin edildi. Hayvanların beslenmesinde kullanılan yemin besin madde kompozisyonu ham proteini %24, ham yağı %3, ham selülozu %5,97, metabolik enerjisi 3300 kcal/kg olacak şekilde dizayn edildi (Bazal rasyon, NRC 1995). Hayvanlara yem ve su ad libitum sağlandı.

Dut Ekstraktının Hazırlanması

Bu çalışmada kurutulmuş beyaz dut meyvesinin (white mulberry fruits, *Morus alba*) ekstraktı kullanıldı. Beyaz dut meyvesi ise Erzincan iline bağlı Yeşilçay köyünden (Türkiye, 39°43'14.3"K 39°21'28.8"D) temin edildi. Kurutulmuş dut meyve ekstraktı elektrikli değirmende öğütülüp 0.5 mL'lik eleklerden geçirilip ışıktan etkilenmemesi için kahverengi cam kavanozlara alındı. Dutun metanolik ekstraktının elde edilmesinde Alam ve ark (2002) ve Khan ve ark (2013) tarafından bildirilen yöntem kullanıldı. Bu yöntemle göre yaklaşık olarak öğütülmüş 500 gr. dut meyvesi kahverengi şişelere alınıp üzerine 1.5 L metanol eklendi. Bu karışım 15 gün boyunca, her 12 saatte bir 1'er saat çalkalayıcı kullanılarak çalkalandı. Dut meyvesi-metanol karışımı Watman süzgeç kâğıdı kullanılarak steril kaba süzülüp, kullanıma hazır hale getirmek için 50 °C basınçta vakumlu evaporator

kullanılarak çözücünün uçması sağlandı ve dut ekstraktı elde edildi. Ekstrakt tartılarak içme suyu ile çözdürülerek ratlara uygulandı.

Diyabet Oluşturulması

Taze sitrat tamponu bir miktar saf suda 2,1 g sitrik asit monohidrat (C₆H₈O₇ . H₂O) çözdürülüp üzerine 2,94 g trisodyum sitrat dihidrat (C₆H₅Na₃O₇ . 2H₂O) eklenerek son hacim 100 mL'ye tamamlandıktan sonra Inolab WTW pH metre kullanılarak pH 4,5'e ayarlandı(Türkmen 2013). Hazırlanan sitrat tamponunda çözdürülen STZ (40 mg/kg) subkutan olarak üç gün ara ile iki doz şeklinde yapıldı. Ratlarda, ilaca bağlı hipoglisemik şoku engellemek için 24 saat süre ile %5 glikoz solüsyonu içme suyu ile verildi. Bir hafta sonra açlık kan glikoz seviyesi ≥ 300 mg/dL seviyesinin üzerinde olan hayvanlar diyabetik olarak kabul edildi (Dik ve ark. 2017).

Deney Gruplarının Oluşturulması

Hayvanlar ortalama 8 haftalık yaşa geldiklerinde gruplar oluşturuldu. Oluşturulan gruplara aşağıdaki uygulamalar yapıldı.

Kontrol grubu (K, n:5): Bazal rasyon verildi. İlave olarak 56 günlük deneme süresince oral gastrik gavaj yöntemiyle 0,5 ml içme suyu verildi.

Deney Grubu 1 (DG 1, n:6): Ratlara çalışma başlangıcında ayrı ayrı subkutan (40mg/kg) 3 gün ara ile 2 doz STZ (STZ- %98 HPLS, Sigma-Aldirich Co., USA) uygulandı. Bazal rasyona ilave olarak 56 günlük deneme süresince oral gastrik gavaj yöntemiyle 0,5 ml içme suyu verildi.

Deney Grubu 2 (DG 2, n:7): Bazal rasyona ilave olarak her hayvana 56 günlük deneme süresince oral gastrik gavaj yöntemiyle 600mg/kg (0,5ml) doz olarak dut ekstraktı verildi

Deney Grubu 3 (DG 3, n:6): Ratlara çalışma başlangıcında ayrı ayrı subkutan (40mg/kg) 3 gün ara ile 2 doz STZ ve Bazal rasyona ilave olarak 56 günlük deneme süresince oral gastrik gavaj yöntemiyle 600mg/kg (0,5 ml) dut ekstraktı verildi.

Araştırma gruplarının canlı ağırlıkları deneme başından itibaren her hafta düzenli olarak alındı. Hayvanlar her hafta aynı gün yemmeden önce (aç karınlarına) tartılarak canlı ağırlıkları belirlendi. Yem ve su tüketimleri ile ilgili veriler, araştırmanın 3. haftasından sonra her sabah saat 08:30 da alındı. Her sabah hayvanların yemliklerinde artan yemler tartılıp, su miktarı ölçülüp kaydedildi ve yerine tekrar tartılarak ve ölçülerek konuldu. Daha önce dut ekstraktı ile yapılmış çalışma bulunmadığı için bu çalışmada kullanılacak doz (600 mg/kg), daha önce dut yaprakları ile yapılmış çalışmadan seçildi (Omar ve ark. 2016). 56 günlük deneysel prosedürün sonunda

ratlar ksilazin (10 mg/kg, periton içi, Ksilazol, Provet, Türkiye) - ketamin (60 mg/kg, periton içi, Ketalar, Pfizer, ABD) anestezisi altında iken kalplerinden kan alınıp servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi edildi ve karaciğer ağırlıkları tespit edildi.

Biyokimyasal ve Histopatolojik Analizler

Ratlardan alınan kan örnekleri 2500 rpm'da 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen serum örneklerinden SP ve PON analizleri gerçekleştirildi. SP düzeyleri Ceron ve Suibela-Martinez (2004) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. Yöntemde laboratuvar şartlarında manuel olarak hazırlanan asetat tamponunda(0,6 M CH₃COONa. 3H₂O, pH 5.0) P-fenilen diamin diklorid (PPD)'e serum örnekleri eklendi ve oluşan rengin absorbansın 550 nm'de spektrometrik olarak ölçülerek elde edilen absorbanslardan serum seruloplazmin değeri hesaplandı (Curzon ve ark. 1960). PON aktivitesi ise Armstrong (2008) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. Bu yöntemle, 1 mM CaCl₂ ve 4 mM paraokson içeren 50 mM laboratuvar şartlarında hazırlanan glisin tampon (50 mM Glisin, 1 mM CaCl₂, pH 10.5, 37 °C) kullanılarak, PON enzimatik olarak hidroliz edilip ve p-nitrofenol oluşturuldu. Oluşan rengin absorbansı 412 nm ölçülerek PON aktiviteleri hesaplandı.

Alınan kan örneklerinden elde edilen serumlarda SP ve PON antioksidan analizleri yapıldı. Karaciğer dokuları %10'luk tamponlu formaldehitte tespit edildikten sonra rutin takip prosedüründen geçirilerek parafine gömüldü ve 5µm kalınlığında kesitler alınarak hematoksilen-eozin ile boyanarak belirlendi (Taylor ve Cote 1994). Histopatolojik değerlendirme amacıyla vasküler konjesyon (VK), yangı (Y), dejenerasyon (D), nekroz (N), kanama (K), safra kanalı hiperplazisi (SKH) ve fibrosis (F) varlığı gruplar arasında karşılaştırıldı ve ışık mikroskobu (Nikon Eclipse E600) ile değerlendirildi.

Histopatolojik olarak lezyon skorlanması yarı kantitatif yöntemle 40X magnification mikroskop (Nikon Eclipse E600, Japonya) altında 10 farklı alan incelenerek değerlendirildi. Skorum: - (yok), + (hafif), ++ (orta) ve +++ (şiddetli) olarak yapıldı. Kan örnekleri 2500 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örneklerinde SP ve PON analizleri gerçekleştirildi.

İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen bulguların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS paket programı kullanıldı. Çalışmada elde edilen bulgulardan canlı ağırlık artışı, karaciğer ağırlığı, serum SP ve PON seviyelerinin analizinde, istatistiksel değerlendirilmesinde Tek yönlü ANOVA, gruplar arasındaki önemliliği belirlemek için *post-hoc* olarak Duncan testi kullanılmıştır. Karaciğerdeki histopatolojik değişimlerin (VK, Y ve D) hesaplanmasında ise Kruskal- Wallis analizi yapılmıştır. Tablolarda veriler $X \pm$ standart hata

şeklinde ifade edilmiş, önemlilik düzeyi ($P<0.05$ olarak belirlenmiştir). Çalışmada yem tüketimi ve su tüketimi ile ilgili hesaplamalarda ise istatistik analiz yapılmayıp matematiksel olarak hesaplanmıştır (SPSS 2011).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Günümüzde hayvan deneylerinde diyabet oluşturmak için STZ uygulaması yoğun olarak kullanılmaktadır. STZ organizmada serbest radikal olarak etki göstererek dokularda birçok hasara neden olmaktadır. En fazla etkilenen dokuların başında pankreas ve karaciğer gelmektedir (Kurçer ve Karaoğlu 2012). Diyabet olan canlıların organizmalarında ve metabolizmalarında önemli değişimler olmaktadır. Bu değişimler kendini başta pankreas dokusunda göstermektedir. Pankreas dokusundaki değişimlerin insülin metabolizmasını etkilediği bilinmektedir. Diğer taraftan karaciğer dokusu ise bu tür etkenlerin (serbest radikallerin) detoksifiye edildiği en önemli organlardan biridir (Take ve ark. 2004). Bu çalışmada diyabet oluşturulan ratlarda karaciğer dokusunda histopatolojik yapı ve kan serumunda SP düzeyi ve PON enzimi aktivitesi üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmada hayvanların karaciğer dokusunda oluşan VK, Y, D, N, H, SKH ve F incelenmiş ve 0 (etkisi yok) ile +3 (Şiddetli) arasında skorlama yapılarak belirlenmiştir.

Karaciğer dokusunun analizinde; safra kanal hiperplazisi ve fibrozis bulguları çalışmada kullanılan gruplardaki hayvanların hiçbirinde görülmemiştir. Hemoraji bulgusu DG 1 ve DG 3'te sadece birer adet hayvanda, nekroz bulgusu ise sadece DG 1'deki 1 hayvanda görülmüştür (Tablo 1-2). Bu nedenle yukarıda belirttiğimiz bulgular ile ilgili istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

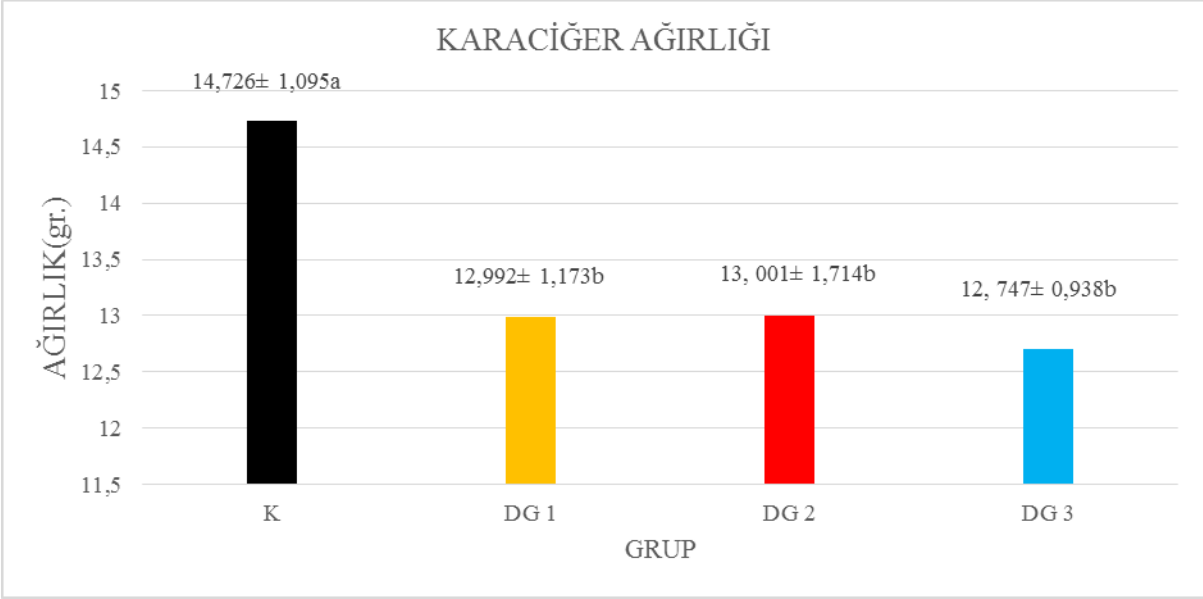
Karaciğer dokusunda yapısındaki vasküler konjesyon K ve DG 2'de 2 adet hayvan, DG 3'te 1 adet hayvanda tespit edilmesine rağmen, diyabet yapılan DG 1'de bütün hayvanlarda belirlenmiştir ($P<0,05$) (Tablo 1-2). Elde edilen bulguları bütün olarak değerlendirdiğimizde STZ karaciğerde vasküler konjesyona neden olduğu, ancak dut ekstraktının ise STZ kimyasal ajanın sebep olduğu VK bulgusunu önemli derecede düşürdüğü tespit edilmiştir ($P<0.05$) (Tablo 2). Karaciğer dokusunun yangı parametresi incelendiğinde K'da görülmezken, DG 2'de 2 adet hayvanda hafif şekilde portal alanlarda, DG 1'de ise gruptaki tüm hayvanlarda görülmüş olup; bunlardan bir tanesinde parankimyal yangı belirgin iken, üç hayvanda portal bölgede orta dereceli yangıya ve üç hayvanda ise hafif dereceli portal yangıya rastlanmıştır. DG 3'te ise yalnızca 2 hayvanda hafif dereceli portal yangıya rastlanmıştır (Tablo1, Şekil 6). Karaciğer dokusunun histopatolojik incelenmesinde STZ uygulaması yangıyı önemli derecede yükseltirken, dut ekstraktının yangının baskılanmasında önemli

etkisinin olduğu görülmüştür ($P<0.01$) (Tablo2). Deney gruplarının karaciğer dokusundaki dejenerasyon bulguları incelendiğinde K'da görülmediği, DG 2'de 1 adet hayvanda, DG 1'de ise tüm hayvanlarda görüldüğü belirlenmiştir ($P<0.01$) (Tablo 2). DG 3'te dejenerasyon üç olguda hafif şiddette gözlenmiştir. Vakuoler dejenerasyonların çoğunlukla sentrilobuler alanlarda olup, şiddetli vakuolizasyonların gözlendiği DG 1'deki bir olguda ise sentrilobuler alanlarla birlikte midzonal ve periportal alanlarda olduğu görülmüştür (Şekil-5). Dut ekstraktının karaciğerde şekillenen dejenerasyonu önemli derecede düzelttiği ancak tüm hayvanlarda meydana gelen hasarı tamamen gideremediği tespit edilmiştir (Tablo 1). Dut ekstraktı karaciğer dokusundaki vasküler konjesyon, yangı ve dejenerasyonu önemli derecede azaltmıştır. Bu durum dut ekstraktının antiinflamatuvar etkisinin olduğunu belirtebilir.

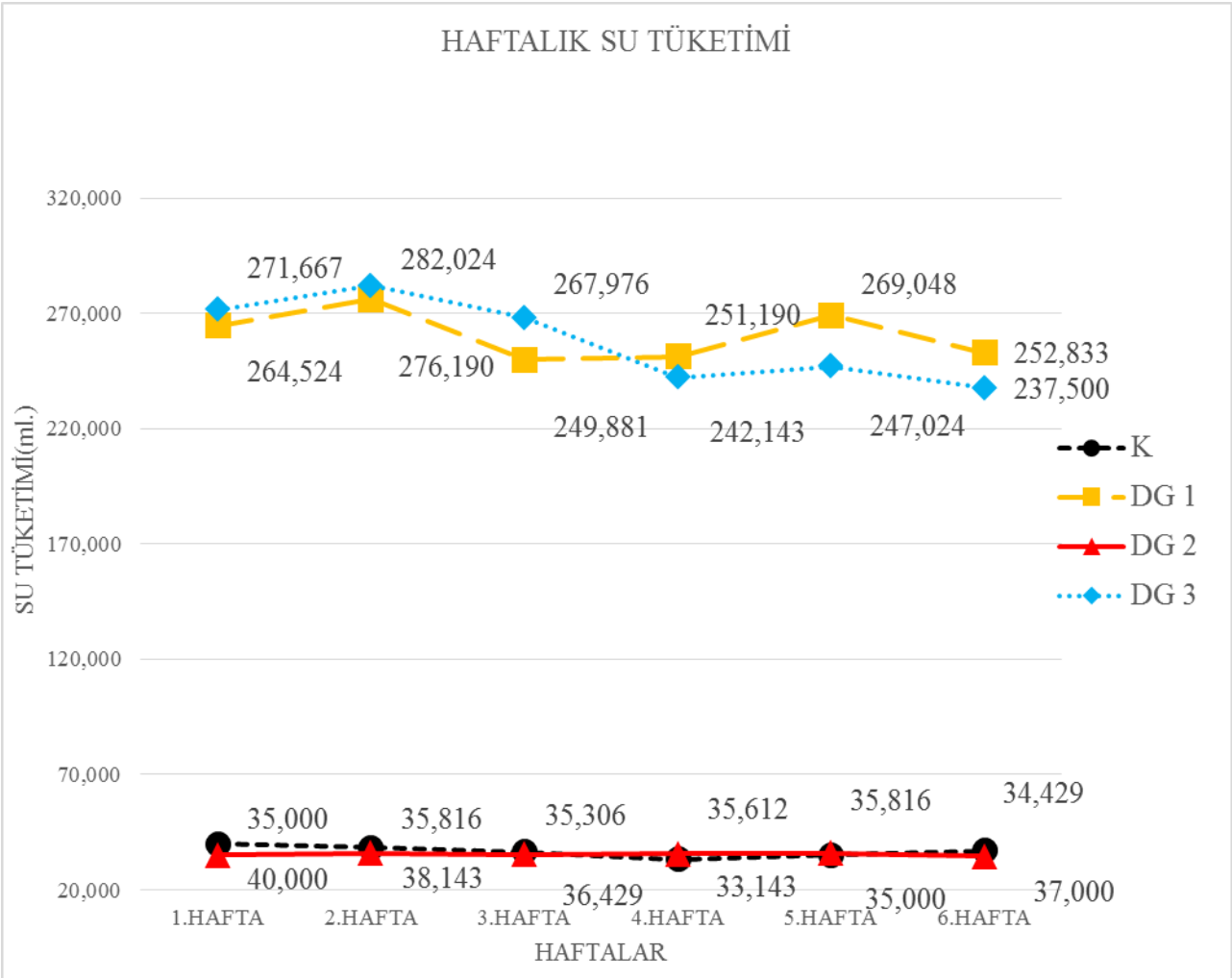
Araştırma gruplarının serum SP düzeyleri ve PON aktiviteleri Tablo 3'de verilmiştir. Grupların SP miktarı arasında istatistiksel farklılık bulunmazken ($P>0,05$), PON aktiviteleri arasındaki farklılıkların önemli derecede olduğu belirlenmiştir ($P<0,05$). PON aktivitesi en yüksek K'da görülürken, en düşük DG 3'de şekillenmiştir. Literatür bilgilerinde dut ekstraktının antioksidan özellikleri olduğu bildirilmektedir (Arabshahi-Delouee ve Urooj 2007, Wattanapitayakul ve ark 2005). Bu çalışmada SP seviyesinin değişmemesinin literatür bulgularla benzerlik göstermemesi, literatür bilgilerinde genellikle total antioksidan ölçümleri yapıldığından ileri gelebilir. Bu çalışmada ise spesifik bir antioksidan madde olan SP seviyesi tespit edilmiştir. Diğer taraftan PON aktivitesinin dut ekstraktı verilen grupta düşük bulunması, dut ekstraktının bu enzimi aktive ederek kullanımını artırmasına bağlanabilir. Bu bilgilerden dut ekstraktının antioksidan özelliğinin sınırlı düzeyde olduğu belirtilebilir.

Deneme gruplarının performans parametrelerinde canlı ağırlık değişimleri Şekil 4 ve Tablo 4'te, yem tüketimleri Şekil 3'te, su tüketimleri Şekil 2' de verilmiştir. Canlı ağırlık artışı en iyi K ve DG 1'de görülmesine rağmen ($P<0,01$), STZ verilen gruplarda önemli derecede düşük bulunmuştur. Yem ve su tüketimi ise tam tersine, STZ verilen gruplarda önemli derecede yüksek bulunurken, verilmeyen gruplarda araştırma süresince fazla bir değişim izlenmemiştir. Streptozotosin özellikle hayvanlarda insülin salınımını azalttığı için katabolizmanın artmasına, enerji açığının kapatılması amacıyla yağ ve protein yıkımına, dolayısıyla kilo kaybına neden olmaktadır (Demirel 2008). Bu çalışmada da hayvanların besin ihtiyaçlarını karşılamak için daha fazla yem ve su tüketmesine rağmen kilo alamaması, insülin direncine bağlanabilir. Çalışmanın sonunda karaciğer ağırlıkları Şekil 1'de verilmiştir. Nitekim en yüksek karaciğer ağırlığı, en fazla canlı ağırlığa sahip olan K'da şekillenmiştir.

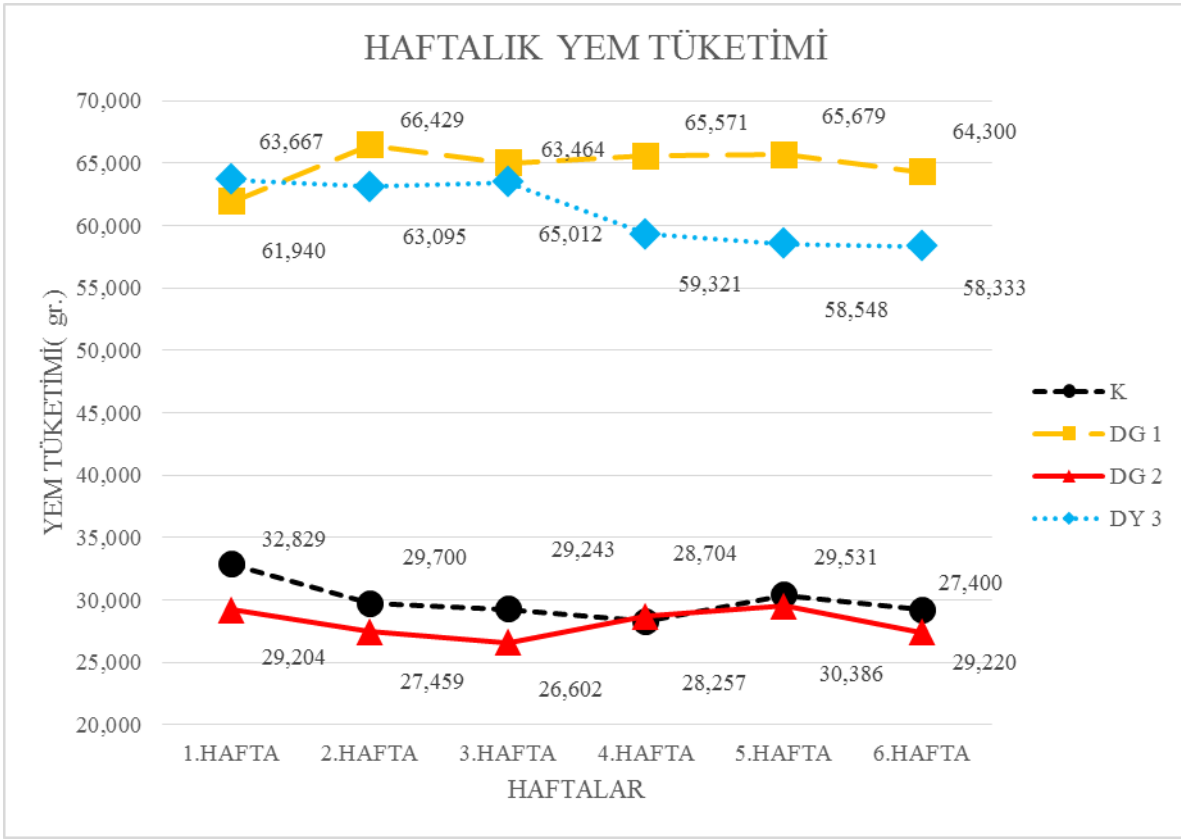
Buradan canlı ağırlık ile karaciğer ağırlığı arasında doğru ilişki olduğu belirtilebilir.



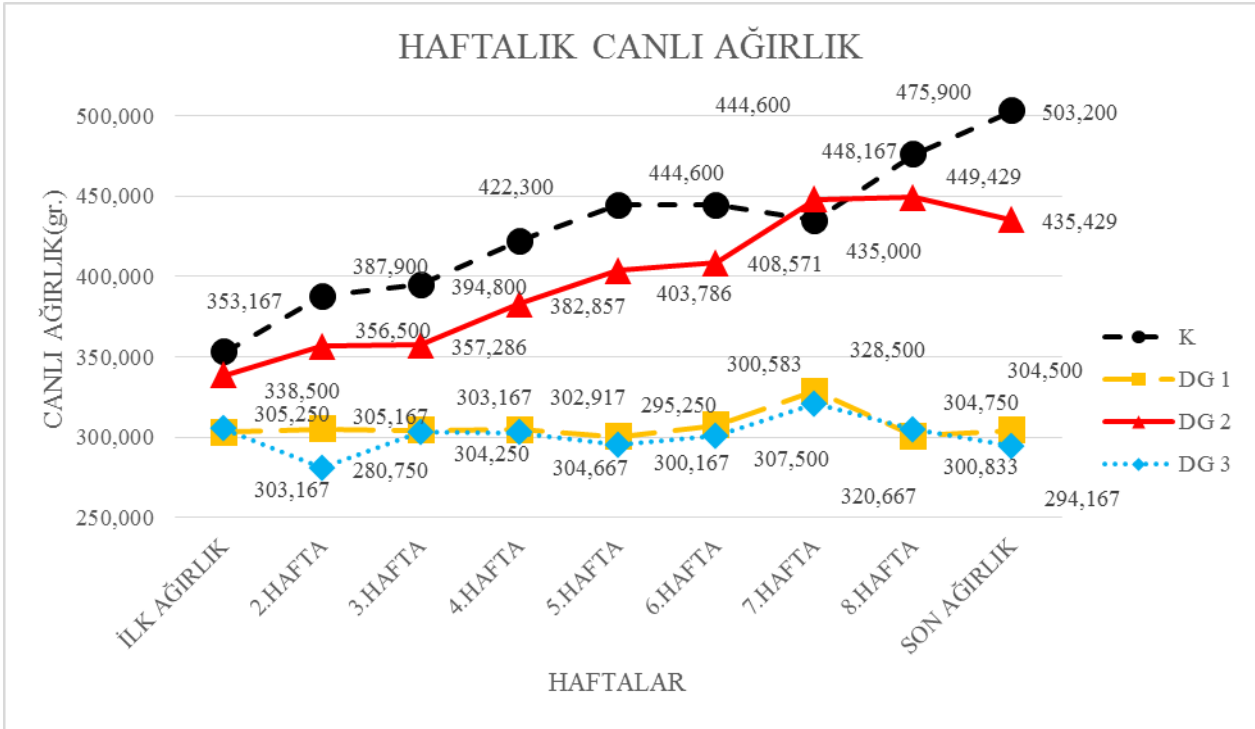
Şekil 1. Grupların deneme sonu karaciğer ağırlığı (gr.)
Figure 1. End-trial liver weight of experimental groups (g.)



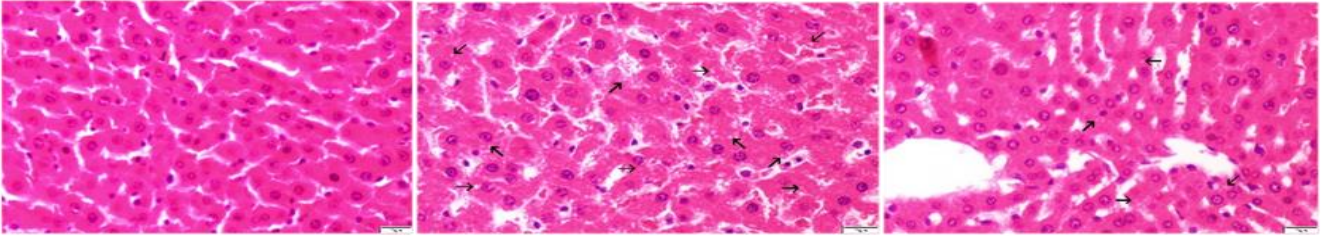
Şekil 2. Gruplarının ortalama su tüketimi (ml.)
Figure 2. Average water consumption of trial groups (ml.)



Şekil 3. Gruplarının ortalama yem tüketimi (gr.)
Figure 3. Average feed consumption of groups (g.)

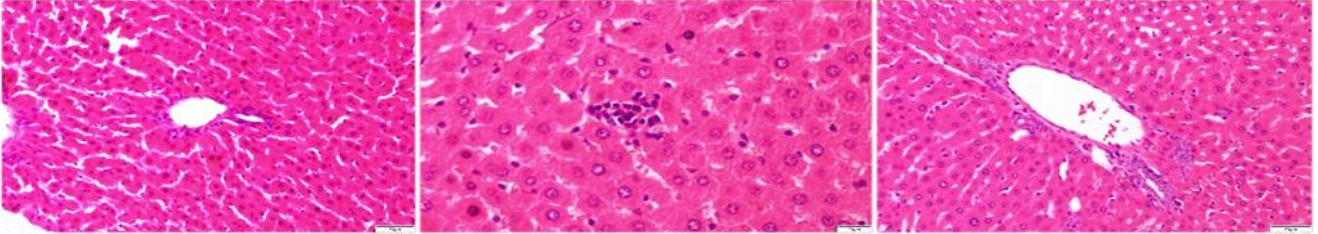


Şekil 4. Gruplarının ortalama canlı ağırlıkları (gr.)
Figure 4. Average live weights of groups (g.)



Şekil 5. K grubunda hepatositlerde vakuolizasyon yok (sol), bar 20 µm; DG 1'de şiddetli vakuolizasyonlar (oklar) (orta), bar 20 µm; DG 3'te hafif vakuolizasyonlar (oklar), bar 20 µm, H&E.

Figure 5. There is no any vacuolization in C (left), bar 20 µm; severe vacuolizations (arrows) in EG 1(middle), bar 20 µm; and mild vacuolizations (arrows) in EG 3 (right), bar 20 µm, H&E.



Şekil 6. K'de yangı yok (sol), bar 50 µm; DG 1'de hafif parankimal yangı (orta), bar 20 µm; ve DG 3'te yangı yok (sağ), bar 50 µm, H&E.

Figure 6. Inflammation absent in C (left), bar 50 µm; mild inflammation in EG 1 (middle), bar 20 µm; and absent to mild inflammation in EG 3 (right), bar 50 µm, H&E.

Tablo 1. Grupların karaciğer dokusunun histopatolojik sonuçlarının skorlanması

Table 1. Scoring of histopathological results of liver tissue of groups

GRUPLAR	PARAMETRELER						
	VK	Y	D	N	H	SKH	F
Kontrol Grubu(K)							
1	0	0	0	0	0	0	0
2	+1	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	+1	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Deney Grubu 1(DG 1)							
1	+1	+2	+1	0	0	0	0
2	+1	+1	+3	0	0	0	0
3	+1	+1	+1	0	0	0	0
4	+2	+2	+1	0	0	0	0
5	+1	+1	+1	0	+1	0	0
6	+1	+2	+1	+1	0	0	0
Deney Grubu 2(DG 2)							
1	+1	0	0	0	0	0	0
2	+1	0	+1	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	+1	0	0	0	0	0
7	0	+1	0	0	0	0	0
Deney Grubu 3(DG 3)							
1	0	+1	+1	0	0	0	0
2	0	+1	+1	0	0	0	0
3	0	0	+1	0	0	0	0
4	+1	0	0	0	+1	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0

VK: Vasküler konjesyon , Y: yangı, D: dejenerasyon, N: nekroz, H: hemoraji, SKH :Safr kanal hiperplazisi, F: fibrozis

Tablo 2. Gruplarının karaciğer histopatolojik verilerinin istatistiksel değerleri
Table 2. Statistical values of liver histopathological data of groups

GRUPLAR	PARAMETRELER					
	Vasküler Konjesyon		Yangı		Dejenerasyon	
	X ± SH	Median	X ± SH	Median	X ± SH	Median
K	0,400±0,245 ^b	0,000	0±0 ^b	0	0±0,0 ^b	0,000
DG 1	1,167±0,167 ^a	1,000	1,500±0,224 ^a	1,500	1,330±0,333 ^a	1,000
DG 2	0,286±0,184 ^b	0,000	0,286±0,184 ^b	0,000	0,143±0,143 ^b	0,000
DG 3	0,167±0,167 ^b	3,000	0,333±0,211 ^b	0,000	0,500±0,224 ^b	0,500
P değeri	*		**		**	

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark anlamlıdır.
** P<0.01, *P< 0.05

Tablo 3. Gruplarının serum antioksidan parametreleri
Table 3. Serum antioxidant parameters of groups

GRUPLAR	PARAMETRELER(Unit/ml)	
	Seruloplazmin	Paraoksonaz
	X ± SH	X ± SH
K	2,349± 0,549	48, 340± 10,405 ^a
DG 1	2,342± 0,410	40,433± 10,986 ^{ab}
DG 2	2,109± 0,580	43,260± 12, 362 ^{ab}
DG 3	2,540± 0,723	33,102± 13,829 ^b
P değeri	NS	*

^{a,b} : Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark anlamlıdır
*(P<0.05). NS: P> 0.05

Tablo 4. Grupların canlı ağırlık değişimleri (gr.)
Table 4. Live weight changes of groups (g.)

ZAMAN	GRUPLAR					P değeri
		K	DG 1	DG 2	DG 3	
		X ± SH	X ± SH	X ± SH	X ± SH	
Deneme Başı	353, 17± 29,77	303,167± 41,33	338,50± 30,58	305,25± 34,79	NS	
1.Hafta	387,90± 19,54 ^a	305,17± 45,52 ^b	356,50±37,58 ^a	280,75±26,97 ^b	**	
2.Hafta	394,80± 20,68 ^a	304,25±42,74 ^b	357,29±41,39 ^a	303,17±31,69 ^b	**	
3.Hafta	422,30± 19,45 ^a	304,67±37,56 ^b	382,86± 42,98 ^a	302,91± 40,74 ^b	**	
4.Hafta	444,60± 22,77 ^a	300,17± 37,04 ^b	403,79± 44,67 ^a	295,25± 34,49 ^b	**	
5.Hafta	444,60± 22,77 ^a	307,50± 35,37 ^b	408,57± 47,78 ^a	300,58± 37,99 ^b	**	
6.Hafta	451,70± 19,94 ^a	303,25± 29,25 ^b	429,86±46,29 ^a	303,17± 37,13 ^b	**	
7.Hafta	475,90± 23,00 ^a	300,83± 28,19 ^b	449,43±47,57 ^a	304,75± 38,15 ^b	**	
Deneme Sonu	503,20± 14,86 ^a	304,50± 33,22 ^c	435,43± 87,45 ^b	294,17± 37,46 ^c	**	

^{a,b,c} : Aynı satırda farklı harfi taşıyan ortalamalar arası istatistiksel fark anlamlıdır.
NS: P> 0.05, ** : P< 0.01

SONUÇ

Araştırmada ratlarda STZ ile indüklenen diyabet modelinde karaciğer dokusunda vasküler konjesyon, yangı ve dejenerasyonun önemli derecede artırdığı, dut ekstraktı uygulamasının ise antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı bu histopatolojik değişiklikleri önemli derecede azalttığı tespit edildi. Ayrıca dut ekstraktını diyabete bağlı olarak azalan PON düzeyini artırarak sınırlı derecede antioksidan etki gösterdiği belirlendi. STZ uygulanan hayvanlara verilen dut ekstraktının hepatoselüler dejenerasyonu azaltmasının nedeni de antioksidan etki ile ilişkili olabilir. Ancak dut ekstraktının antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinin ortaya konulması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

TEŞEKKÜR

➤ *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (15.05.2019/522).*

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKÇA

- Alam AHMK, Rahman MAA, Baki MA, Rashid MH, Bhuyan MSA, Sadik G.** Antidiarrhoeal principle of *Achyranthes feruginea* Roxb. and their cytotoxicity. *Pharm. J.* 2002; 12: 1–4.
- Ali AB, Zhang Q, Lum YK, Fang D, Retnam L.** Expression of major HDL-associated antioxidant. PON-1 is gender and regulated during inflammation. *Free Rad Bio & Me.* 2003; 34: 824-829
- Ameen AM, Hapipah MA, Abdul AK, Mohd NS, Salmah I.** Evaluation of the antiulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally induced gastric ulcer in rats. *Biomed Res.* 2009; 20: 35–39.
- Arabshahi-Delouee S, Urooj A.** Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chem.* 2007; 102: 1233–1240.
- Armstrong D.** *Advanced Protocols in Oxidative Stres-Humana Press, New York.* 2008.
- Balakrishnan CR, Goswami SL.** Biochemical polymorphism in river buffalo. In *Buffalo and goats in Asia, genetic diversity and its application.* NM Tulloh (Ed), *Proceeding of a seminar Kuala Lumpur, Malaysia.* 1991; 34: 20-27.
- Banfield F.** Council of Scientific & Industrial Research, *The Wealth of India: A Dictionary of Indian Raw Materials and Industrial Products; Raw Materials, Ed; B. N. Sastri, Vol. 114, Issue 2950,1950; 49.*
- Başkaya Z.** Gelişimi ve Dağılışı Bakımından Türkiye İpek böcekçiliğinde Bilecik İlinin Yeri, Sorunları ve Çözüm Önerileri. *Doğu Coğrafya Dergisi .* 2014; 18 (30).
- Boles A, Kandimalla R, Reddy PH.** Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* Elsevier B.V.; 2017; 1026–36.

- Ceron JJ, Martínez-Subiela S.** An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res.* 2004; 35 (6): 671-679.
- Choi EM, Hwang JK.** Effects of *Morus alba* leaf extract on the production of nitric oxide prostaglandin E2 and cytokines in RAW2647 macrophages. *Fitoterapia.* 2005; 76: 608–613.
- Curzon G, Vallet L.** The purification of human ceruloplasmin. *Biochem J.* 1960; 74: 279-287.
- Demirel M.** İnsülin Tedavisi Başlanan Diabet Hastalarında Kilo Değişimi ve Bunu Etkileyen Parametrelerin İrdelenmesi. T.C Sağlık Bakanlığı Şişli Eftal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği Şefliği. *Uz Tez.* 2009; 5.
- Dik B, Bas AL, Yazıhan N.** The effect of midkine on growth factors and oxidative status in an experimental wound model in diabetic and healthy rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 2017; 95(5): 604-609.
- Du J, He ZD, Jiang R.W, Ye WC, Xu HX, But PPH.** Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry.* 2003; 62: 1235–1238.
- Enkhmaa B, Shiwaku K, Katsube T, Kitajima K, Anuurad E, Yamasaki M.** Mulberry (*Morus alba* L.) leaves and their major flavonol quercetin 3-(6-malonylglucoside) attenuate atherosclerotic lesion development in LDL receptor-deficient mice. *J Nutr.* 2005; 135: 729–734.
- Fleming RE, Whi IP, Gitlin JD.** Introduction of ceruloplasmin gene expression in rat lung during inflammation and hyperoxida. *American Journal of Physiology.* 1991; 260: 68-74.
- Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E.** Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Science.* 1995; 56, 21, 1749-58.
- Halliwel B.** Reactive oxygen species in living systems, source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine.* 1991; 30, 91, 3, 14-22.
- Katsube T, Imawaka N, Kawano Y, Yamazaki Y, Shiwaku K, Yamane Y.** Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. *Food Chem.* 2006; 97: 25–31.
- Khan MA, Rahman AA, Islam S, Khandokhar P, Parvin S, Islam MB, Hossain M, Rashid M, Sadik G, Nasrin S, Mollah MN, Alam AH.** A comparative study on the antioxidant activity of methanolic extracts from different parts of *Morus alba* L. (Moraceae). *BMC Research Notes.* 2013; 6: 24.
- Kikuchi T, Nihei M, Nagai H, Fukushi H, Tabata K, Suzuki T, Akihisa T.** Albinol A from the root bark of *Morus alba* L. induces apoptotic cell death in HL60 human leukemia cell line. *Chem Pharm Bull.* 2010; 58: 568–571.
- Kim SH, Kim NJ, Choi JS, Park JC.** Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* bureau. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 1993; 22: 68–72.
- Kuo CC, Liu TW, Chen LT, Shiah HS, Wu CM, Cheng YT, Pan WY, Liu JF, Chen KL, Yang YN, Chen SN, Chang JY.** Combination of arsenic trioxide and BCNU synergistically triggers redox-mediated autophagic cell death in human solid tumors. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51: 2195–2209.
- Kurçer Z, Karaoğlu D.** Deneysel Diyabet Modellerinde Alloksan ve Streptozotosin Kullanımı. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism.* 2012; 16: 34-40.
- Lee YJ, Choi DH, Kim EJ, Kim HY, Kwon TO, Kang DG,**

- Lee HS.** Hypotensive, hypolipidemic, and vascular protective effects of *Morus alba* L. in rats fed an atherogenic diet. *Am J Chin Med.* 2011; 39: 39–52.
- Mcpearson RA .** *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Method*, In, Henry JB, editör, Philadelphia, W.B. Saunders Company.1996; s. 237-57
- Niidome T, Takahashi K, Goto Y, Goh SM, Tanaka N, Kamei K.** Mulberry leaf extract prevents amyloid beta-peptide fibril formation and neurotoxicity. *Neuroreport.* 2007; 18: 813–816.
- Niumsakul S, Bauer JA.** Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 80-87.
- NRC.** *Nutrient Requirements of Laboratory Animals, Fourth Revised Edition*, National Academies Press Washington D.C.1995.
- Omar SIA, Amer H, Maher A.** Effects of *Morus alba* leaves extracts on sperm count and testicular weight in experimentally streptozotocin induced diabetes male rats. 3rd Scientific Conference- College of Veterinary Medicine- University of Tikrit. 2016; 6-10.
- Singab BIR, El-Beshbishy HA, Yonekawa M, Nomura T, Fukai T.** Hypoglycemic effect of Egyptian *Morus alba* root bark extract: effect on diabetes and lipid peroxidation of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 2005; 100: 333–338.
- Türkmen R.** Klorprifos uygulanan diyabetli ratlarda likopenin antioksidan ve hipoglisemik etkilerinin araştırılması. Doktora tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2013.
- SPSS.** *Statistical Packages for the Social Sciences 20th ed.* IBM: Chicago. 2011.
- Take G, Karabay G, Yazıcı AC, Erdoğan D.** Dişi Sıçanlarda Streptozotosin ile Oluşturulmuş Diyabetin Kalp Kası Üzerine Etkisinin Ultrastrüktürel Düzeyde Gösterilmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.* 2004; 30(3): 199-204.
- Taylor CR, Cote RJ.** *Immunomicroscopy: A Diagnostic Tool for the Surgical Pathologist*, 2nd ed. Philadelphia, WB Saunders. 1994.
- Wang CP, Wang Y, Wang X, Zhang X, Ye JF, Hu LS, Kong LD.** Mulberroside a possesses potent uricosuric and nephroprotective effects in hyperuricemic mice. *Planta Med.* 2011; 77: 786–94.
- Wattanapitayakul SK, Chularojmontri L, Herunsalee A, Charuchong-kolwongse S, Niumsakul S, Bauer JA.** Screening of antioxidants from medicinal plants for cardioprotective effect against doxorubicin toxicity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005; 96: 80-87.
- Yaman T, Doğan A.** Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulan Sıçanlarda Meşe Palamudu (*Quercus branti* Lindl.) Ekstraktların Karaciğer ve Pankreası Koruyucu Etkileri. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* 2016; 1(2): 7-15.

Comparison of Effects of Administration of Oral or Topical Boron on Wound Healing and Oxidative Stress in Rats

Meral KONCA¹, Musa KORKMAZ^{2*}

¹Asya Veterinary Clinic, Afyonkarabısar

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Afyonkarabısar

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the effects of boron on wound healing and further evaluate some antioxidant and oxidant characteristics. A total of 32 adult male Wistar rats were divided into four groups; control group, local boron (LB) group, oral boron (OB) group, and oral+local boron (OLB) group. Under general anesthesia, a circular full-thickness skin defect with a diameter of 1.5 cm was created on the dorsal region of the rats. Boron (10 mg/kg) was administered per oral in OB group and 3% boric acid was administered topically in LB group, and 10 mg/kg boron was administered per oral and 3% boric acid was applied topically in OLB group. Control group did not receive any medication. In histopathological examination, re-epithelialization, granulation tissue formation, collagen formation, inflammatory cell formation, and neovascularization were found to be more superior in LB and OLB groups as compared to the control and OB groups. Blood and wound tissue MDA levels in OB and OLB groups were lower with respect to the control and LB groups ($p<0.05$). In conclusion, oral administration of boron in addition to topical treatment contributes the wound healing due to the antioxidant property of boron in wound healing process.

Keywords: Antioxidant, boron, malondialdehyde, rat, wound healing

Ratlarda Oral veya Topikal Olarak Uygulanan Borun Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, borun yara iyileşmesi ve bazı antioksidan ve oksidan parametreler üzerine olan etkisinin belirlenmesidir. Çalışmada, toplam 32 adet erişkin erkek Wistar ratı, kontrol grubu, lokal bor (LB) grubu, oral bor (OB) grubu ve oral+lokal bor (OLB) grubu olmak üzere ratgele dört gruba ayrıldı. Genel anestezi altında, ratların sırt bölgesinde 1,5 cm çapında dairesel tam kat bir deri defekti oluşturuldu. OB grubunda bulunan ratlara oral olarak 10 mg/kg bor, LB grubunda bulunan ratlara topikal % 3'lük borik asit, OLB grubunda bulunan ratlara oral 10 mg/kg bor ile birlikte topikal olarak % 3'lük borik asit uygulandı. Kontrol grubuna ise herhangi bir ilaç uygulanmadı. Histopatolojik inceleme için yara dokusu örnekleri alındı. Histopatolojik olarak; repitelizasyon, granülasyon dokusu oluşumu, kollagen formasyonu, yangısal hücre oluşumu ve neovaskülarizasyonun LB ve OLB gruplarında kontrol ve OB grubuna göre daha iyi olduğu belirlendi. OB ve OLB gruplarında kan ve yara dokusu MDA düzeylerinin kontrol ve LB grubuna göre düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$). Sonuç olarak; yara sağaltımında, lokal olarak borik asit kullanıma ek olarak antioksidan özelliklerinden dolayı oral bor kullanımının yara iyileşmesine katkı sağladığı söylenebilir

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, bor, malondialdehit, rat, yara iyileşmesi

To cite this article: Konca M, Korkmaz M. Comparison of Effects of Administration of Oral or Topical Boron on Wound Healing and Oxidative Stress in Rats. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):11-18.

Submission: 14.11.2019 Accepted: 06.01.2020 Published Online: 21.01.2020

ORCID ID; MK: 0000-0003-2149-3572, MK*: 0000-0002-7646-0009

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

INTRODUCTION

Wound healing is a complex physiological process involving interrelated stages and affected by many factors. To understand the fundamental principles of wound healing, it is necessary to know the physiology of the process of wound healing including the stages such as hemostasis, inflammation, proliferation, and remodeling (Keast and Orsted 1998, Beckert et al. 2007, Singh et al. 2017). The basic approach for ensuring wound healing in a shorter period of time and ideal scar formation is affected by inflammatory cells, platelets, and some mediators that play a key role in this process. Besides the factors such as collagen synthesis, angiogenesis and extracellular matrix formation are also effective in wound healing (Werner and Grose 2003, Kapan et al. 2008, Özler et al. 2010).

Boron is an essential element and it is generally used in industrial, agricultural and cosmetic applications as well as in the field of healthcare (Murray 1998). Boron has very important role in mineral and hormone metabolism, bone development, antioxidant defense system, wound healing, energy metabolism, and immune system (Kuru and Yarat, 2018). It is an element essential for maintaining the balance and amount of magnesium, phosphorus, and calcium, exclusively in the bone (Wilson and Ruszler 1998). In various studies, it has been demonstrated that boron has antioxidant (Ince et al. 2010, Uçkun 2013, Coban et al. 2015), hepatoprotective (Ince et al. 2012), and anti-genotoxic effects ((Ince et al. 2014). Boron is a wound healing material, and it has been reported that 3% boric acid solution can cure deep wounds (Blech et al. 1990a). Nowadays, borates are used in wound treatment at very low concentrations. Although action mechanism of boron in wound healing is not completely known, however some experiments have revealed that it may be associated with protein, collagen and proteoglycan synthesis (Benderdour et al. 1998, Nzietchueng et al. 2002). Boron regulates the production of the extracellular matrix that plays a significant role in providing protein, collagen, and proteoglycans to the environment in wound healing. Boron hydrogel formulation has also been shown to yield successful results in the healing of burns. This borate formulation is thought to positively affect the healing of burns through complex mechanisms such as stimulation of cell migration, immune response, vascularization and growth factor expression (Demirci et al. 2015).

The purpose of this study was to determine the effect of oral or topical administered borax decahydrate on experimentally induced wound healing and to evaluate some antioxidant and oxidant parameters in wound tissue and blood.

MATERIAL and METHOD

The study was approved by the Local Animal Ethical Committee (07.09.2019/117). A total of 32 adult male Wistar rats having weight between 200-250 g were randomly divided into four groups as control group (n=8), local boron (LB) group (n=8), oral boron (OB) group, and oral+local boron (OLB) group (n=8). Animals were fed with standard rat feed and water *ad libitum*. Furthermore, boron level of drinking water of all rats was determined by ICP-MS (7700x, Agilent, USA) (Gultepe et al. 2018).

Surgical procedure

The intramuscular route of 10 mg/kg xylazine (Alfazine 2%®, Egevet) and 100 mg/kg ketamine hydrochloride (Alfamine 10%®, Egevet) were used for general anesthesia.

The hair on the dorsal region of the rats were shaved by a razor blade without damaging the skin and the dorsal region was cleaned with povidone-iodine. Two circular full-thickness skin defects with a diameter of 1.5 cm were performed on the dorsal region of the rats under general anesthesia. After performing the skin defect, the wounds were cleaned only with physiological saline solution. Control group did not receive any medication during the study period. 10 mg/kg borax decahydrate ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, Eti Mine Institute, Kırka, Eskişehir) was administered by oral gavage to the rats in OB group, 3% boric acid (H_3BO_3 , Eti Mine Institute, Kırka, Eskişehir) was administered topically to the rats in LB group, 10 mg/kg borax decahydrate was administered orally and 3% boric acid was administered topically by spraying to the rats in the oral+local boron group. The course of wound healing was monitored by plotting wound sizes on acetate paper on days 0, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19 and 21.

Collection of blood samples

The whole blood samples in EDTA were used for the measurement of concentrations of MDA and GSH, whereas SOD and CAT were measured in the rest of the samples following the separation for erythrocyte preparation.

Preparation of erythrocytes and wound tissue homogenate

Erythrocyte lysate was prepared by the method described by Winterbourn et al. (1975). The lysate was stored at 4°C until analysis within three days. Under general anaesthesia, 1 g of skin tissues were removed from wound sites. Wound tissue homogenate was prepared by the method described by Bolcal et al. (2007). Tissue supernatants were stored in a deep freezer at -70°C until analysed.

Measurement of Oxidant and Antioxidant Enzyme Levels

The levels of MDA in blood and tissue homogenates were assayed by Draper and Hadley (1990) and Ohkawa et al. (1979) respectively. Both blood and tissue homogenates GSH concentrations were determined by using a spectrophotometer (Shimadzu 1601 UV-VIS, Tokyo, Japan) (Beutler et al. 1963). The antioxidant enzyme activity of SOD was measured as described by Sun et al. (1988). CAT activity in erythrocyte lysate and tissue homogenate was measured by the method described by Luck (1955) and Aebi (1983).

Measurement of Hemoglobin (Hb) and Protein Concentrations

The concentration of Hb was determined by the method according to Drabkin and Austin (1935) and tissue protein content was measured according to the colorimetric method of Lowry et al. (1951).

Histopathological Examination

After obtaining blood and wound tissue samples, the animals were euthanized by administering a high dose of anaesthetic. Skin samples were placed in 10% formaldehyde for histopathological examination. They were processed and embedded in paraffin blocks and were cut into 5 μm thickness with a microtome. After deparaffinisation, these sections were stained with the hematoxylin-eosin and evaluated according to the wound healing scale (Table 1).

Statistical Analysis

The ANOVA test was performed to determine the differences between the concentrations of MDA, GSH, SOD and CAT in blood samples and wound tissue. The wound healing scores between the groups were evaluated by the Kruskal-Wallis test. Data were presented as mean \pm standard deviation and $p < 0.05$ and 0.01 were considered statistically significant.

RESULTS

The level of boron supplemented in drinking water of rats was 0.324 ppb. Histopathologically, when all wound scores were taken into consideration, Reepithelialization, granulation tissue formation, collagen formation, inflammatory cell formation, and neovascularization were higher in LB and OLB groups. Although no ulcer formation was observed in all animals in OLB group ($p < 0.05$), ulcer formation was lower in LB group than control and OB groups (Table 2) (Figure 1). Reepithelialization, granulation tissue formation, inflammatory cell formation, and neovascularization scores were highest particularly in OLB group. The reepithelialization score was significantly higher in LB and OLB groups than control and OB groups ($p < 0.05$). There was a statistically significant difference between the control

and LB, OB and OLB groups in terms of granulation tissue formation ($p < 0.05$). While the least collagen formation was observed in the control group, the highest level of collagen formation was noted in LB group. Collagen formation was significantly higher in the LB, OB and OLB groups compared to the control group ($p < 0.05$). The presence of inflammatory cells and neovascularization score were significantly higher in LB, OB and OLB groups than control group ($p < 0.05$).

When the wound surface areas were compared, the wound areas shrank more rapidly in LB and OLB groups when compared with the control group. It was determined that the wounds shrank more rapidly in LB group and more than half of the wound areas shrank on the 7th day (Table 3). A statistically significant difference was observed between LB group and the control and OLB groups in terms of the wound area on the 7th day ($p < 0.05$). In the inter-group comparison, the wound areas were observed to be significantly smaller on days 7, 9, 11, 13, 17, 19 and 21 in the LB, OB and OLB groups than control group ($p < 0.05$).

Changes in GSH, MDA, SOD and CAT levels in all groups are given in Table 4. While the blood GSH level was determined to be higher in OB group compared to other groups, the lowest blood GSH level was observed in the control group. Changes in the blood GSH level were not statistically significant between the groups ($p > 0.05$). The blood and tissue MDA levels were lower in OB and LB groups than control and OLB groups. The blood MDA levels in the OB group were significantly lower than those in the OB and OLB groups ($p < 0.05$). Especially the blood SOD level in LB group had more concentration as compared to other groups. A statistically significant difference was determined between the control and LB groups in terms of the blood SOD level ($p < 0.05$). While the highest blood CAT level was found in the LB group, there was a statistically significant difference in blood CAT levels between the control and LB groups ($p < 0.05$).

The wound tissue GSH, MDA, SOD and CAT levels in the control, LB, OB and OLB groups are given in Table 5. While the highest wound tissue GSH level was determined in the OB group, no statistically significant difference was determined between the groups in terms of wound tissue GSH levels ($p > 0.05$). Wound tissue MDA levels were significantly lower in the OB and OLB groups in comparison with the control and LB groups ($p < 0.05$). There was a statistically significant difference between the control and LB group and between the control group and OLB group in terms of wound tissue SOD levels ($p < 0.05$). There was no statistically significant difference between the groups in terms of wound tissue catalase levels ($p > 0.05$).

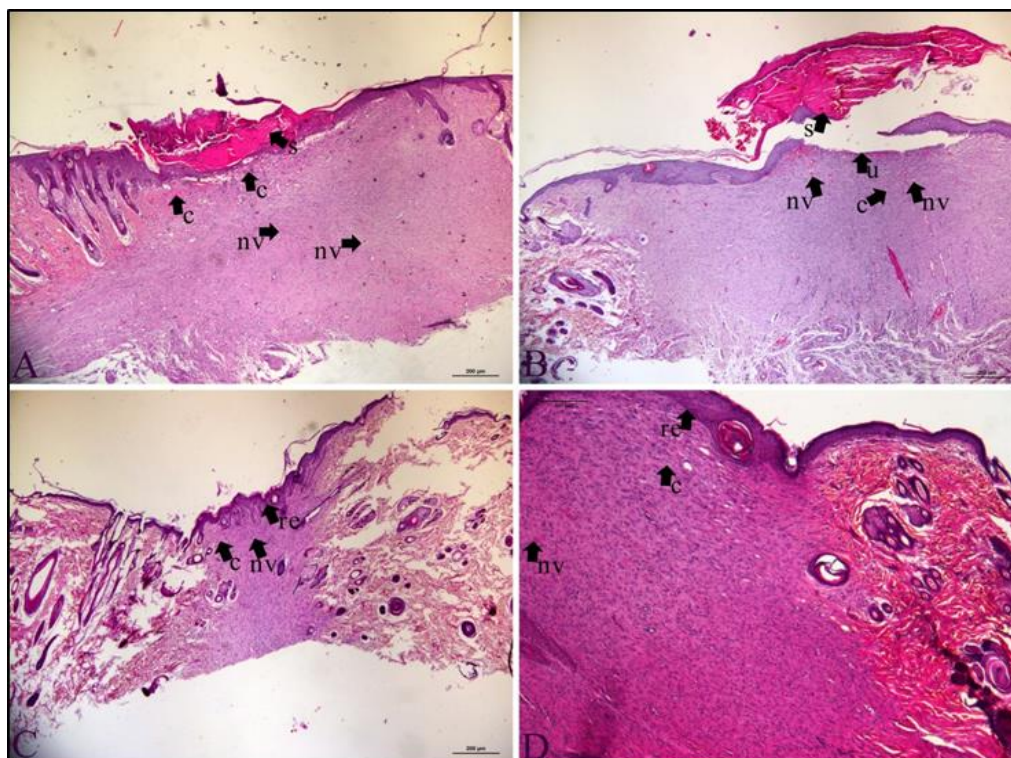


Figure 1. Histopathological sections in control (A), oral boron (B), local boron (C) and oral+local boron groups (H&E staining)
(c: collagen, s: scab, nv: neovascularization, u: ulcer, re: reepithelization)

Table 1. Wound healing score evaluation criteria

Score	Reepithelization	Granulation tissue	Collagen accumulation	Presence of inflammatory cells	Neovascularization	Ulcer
0	No	No or immature	No	No	No	Wide, deep ulcer, abscess
1	Partial	Little	Little	Little	Less than 5 blood vessels	Wide ulcer
2	Completed but thin or immature	Moderate maturation	Moderate	Moderate	6-10 blood vessels	None or very small
3	Completed and mature	Mature	Abundant	Abundant	More than 10 blood vessels	None

Table 2. Wound healing scores in the control (n = 8), local boron (LB) (n = 8), oral boron (OB) (n = 8) and oral + local boron (OLB) (n = 8) groups (mean \pm SD)

	Reepithelization	Granulation tissue	Collagen accumulation	Presence of inflammatory cells	Neovascularization	Ulcer
Control group	0,37+0,5 ^b	0,37+0,5 ^d	0,50+0,5 ^b	0,62+0,5 ^c	0,62+0,5 ^c	0,62+0,5 ^a
LB group	1,61+0,5 ^a	1,62+0,5 ^{ab}	1,50+0,5 ^a	1,5+0,5 ^{ab}	1,62+0,5 ^b	0,12+0,3 ^a _b
OB group	0,5+0,5 ^b	1,37+0,5 ^c	1,25+0,4 ^a	1,25+0,4 ^b	1,12+0,6 ^b	0,37+0,5 ^a _b
OLB group	2,0+0 ^a	2,0+0 ^a	1,0+0 ^{ab}	2,0+0 ^a	2,0+0 ^a	0 ^c
P	0,0001	0,0001	0,001	0,0001	0,0001	0,02

^{abc} Different letters in same column indicate significant differences ($p < 0.05$)

Table 3. Changes of wound surface areas in the control (n = 8), local boron (LB) (n = 8), oral boron (OB) (n = 8) and oral + local boron (OLB) (n = 8) groups at measurement days (mean \pm SD)

Days	Control group	LB group	OB group	OLB group
0	1,77 \pm 0	1,77 \pm 0	1,77 \pm 0	1,77 \pm 0
1	1,77 \pm 0	1,68 \pm 0,12	1,74 \pm 0,08	1,71 \pm 0,11
3	1,68 \pm 0,12	1,41 \pm 0,22	1,55 \pm 0,27	1,65 \pm 0,17
5	1,44 \pm 0,22	1,22 \pm 0,3	1,32 \pm 0,28	1,41 \pm 0,25
7	1,11 \pm 0,35 ^a	0,72 \pm 0,29 ^b	1,07 \pm 0,19 ^{ab}	1,12 \pm 0,21 ^a
9	0,72 \pm 0,30 ^a	0,35 \pm 0,23 ^b	0,59 \pm 0,17 ^{ab}	0,70 \pm 0,3 ^{ab}
11	0,39 \pm 0,12 ^a	0,18 \pm 0,08 ^b	0,33 \pm 0,11 ^{ab}	0,36 \pm 0,15 ^a
13	0,31 \pm 0,09 ^a	0,16 \pm 0,07 ^b	0,20 \pm 0,07 ^b	0,24 \pm 0,05 ^{ab}
15	0,16 \pm 0,07	0,10 \pm 0,05	0,12 \pm 0,04	0,13 \pm 0,03
17	0,19 \pm 0,10 ^a	0,08 \pm 0,03 ^b	0,09 \pm 0,04 ^b	0,11 \pm 0,04 ^{ab}
19	0,14 \pm 0,04 ^a	0,02 \pm 0,02 ^c	0,08 \pm 0,05 ^b	0,05 \pm 0,03 ^{cb}
21	0,06 \pm 0,03 ^a	0,003 \pm 0,004 ^c	0,03 \pm 0,03 ^b	0,008 \pm 0,01 ^{cb}

^{abc} Different letters in same line indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

Table 4. Blood GSH, MDA, SOD and CAT values in the control (n = 8), local boron (LB) (n = 8), oral boron (OB) (n = 8) and oral + local boron (OLB) (n = 8) groups (mean \pm SD)

GROUPS	GSH (nmol/ml)	MDA (nmol/ml)	SOD (U/mgHb)	CATALASE (μ /mgHb)
Control group	35,43 \pm 4,80	12,25 \pm 1,93 ^a	18,41 \pm 2,61 ^b	762,11 \pm 184,33 ^b
LB group	37,94 \pm 6,39	9,97 \pm 1,73 ^{ab}	26,31 \pm 6,38 ^a	1393,33 \pm 556,68 ^a
OB group	39,56 \pm 6,08	6,87 \pm 2,80 ^b	19,38 \pm 1,94 ^b	849,56 \pm 143,24 ^b
OLB group	37,01 \pm 4,97	10,69 \pm 2,75 ^a	21,10 \pm 5,30 ^{ab}	964,93 \pm 219,17 ^{ab}
<i>P</i>	0,524	0,001	0,009	0,003

^{abc} Different letters in same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

Table 5. Wound tissue GSH, MDA, SOD and CAT values in the control (n = 8), local boron (LB) (n=8), oral boron (OB) (n = 8) and oral + local boron (OLB) (n = 8) groups (mean \pm SD)

GROUPS	GSH (nmol/gr tissue)	MDA (nmol/gr tissue)	SOD (U/ μ g protein)	CATALASE (μ / μ g protein)
Control group	10,84 \pm 0,52	3,34 \pm 0,28 ^a	1,68 \pm 0,34 ^b	0,02 \pm 0,007
LB group	10,87 \pm 0,77	3,16 \pm 0,13 ^{ab}	3,41 \pm 0,97 ^a	0,03 \pm 0,01
OB group	11,18 \pm 2,56	3,08 \pm 0,15 ^b	2,53 \pm 0,49 ^{ab}	0,02 \pm 0,004
OLB group	11,01 \pm 1,42	3,09 \pm 0,17 ^b	3,41 \pm 0,98 ^a	0,04 \pm 0,05
<i>P</i>	0,848	0,044	0,0001	0,386

^{ab} Different letters in same column indicate significant differences ($p < 0.05$) between groups.

DISCUSSION

It is emphasized that the administration of 3% boric acid accelerates especially deep wound healing and reduces two-thirds of the time needed to be spent in intensive care (Blech et al. 1990a). Boron plays an important role in the wound repair process by affecting extracellular matrix synthesis that increases the release of proteoglycans, collagen, and proteins (Benderdour et al. 1997, Benderdour et al. 1998). Demirci et al. (2015) reported that the application of boron-containing hydrogel supports more rapid wound healing by stimulating epithelization, cell migration, and angiogenesis in burn injuries in rats. It has been shown that the application of boron-containing hydrogel to wounds in diabetic rats contributes to wound healing positively (Demirci et al. 2016). In our study, 3% boric acid among boron compounds was administered topically to rats, and borax decahydrate was administered per oral at a dose of 10 mg/kg for 21 days. In LB and OLB groups, wound healing scores, such as reepithelization, granulation tissue formation, collagen formation, inflammatory cell formation, and neovascularization were higher than those in the control and OB groups. The highest wound healing scores were determined in the OLB group in comparison with other groups. In this study, our results were consistent with above mentioned studies (Benderdour et al. 1998, Nzietchueng et al. 2002, Demirci et al. 2016, Blech et al. 1990b) that the wound healing process by affecting TNF- α release, extracellular matrix synthesis and stimulating angiogenesis and epithelization increased the release of proteoglycans, collagen and proteins.

Demirci et al. (2016) applied boron-containing hydrogel to the wounds formed in diabetic rats and stated that the application of boron-containing hydrogel made wound areas shrink faster on the 8th day of wound healing in comparison with the control group. In another study, it was reported that antioxidant agents vitamin E and α -tocopherol added to the diet in rats made the wound area close more rapidly compared to the control group (Musalmah et al. 2005). Uyar et al. (2017) applied asiatic acid and yarrow cream to the wounds they formed in rats and reported that wound areas shrank more rapidly in both applications in comparison with the control group. In this study, wound areas were observed to shrink faster, especially in LB and OLB groups, than in the control group. In LB group, the wounds were significantly smaller on the 7th day compared to the control and OLB groups ($p < 0.05$). Furthermore, wound areas were significantly smaller in LB, OB and OLB groups on days 7, 9, 11, 13, 17, 19 and 21 than in the control group ($p < 0.05$). In this respect, it can be said that boron that stands out with its antioxidant properties accelerates wound healing macroscopically.

MDA is one of the most important parameter of lipid peroxidation. It is reported that antioxidant agents, raxofelast and taurine, significantly reduce lipid peroxidation as a direct effective antioxidant and stabilize the plasma membrane as an indirect antioxidant (Değim et al. 2002). Moreover, the addition of 200 mg/kg vitamin E and 200 mg/kg α -tocopherol significantly reduces the wound tissue MDA levels in diabetic rats (Musalmah et al. 2005). It is indicated the routine wound application such as asiatic acid and yarrow cream to the wounds reduces wound tissue MDA levels compared to the control group in rats (Uyar et al., 2017). In another study, it has been reported that the application of curcumin, which is an antioxidant agent, significantly reduces MDA levels in wound tissue in rats (Panchatcharam et al. 2006). Korkmaz et al. (2019) stated that intra-articularly administered borax decahydrate reduces the articular cartilage MDA levels with experimentally induced osteochondral defect in rats. Several studies have investigated the effects of boron on some antioxidant or oxidant enzymes in various tissues (such as cartilage tissue, liver, kidney, brain, and heart) (Coban et al. 2015, Ince et al. 2014, Kucukkurt et al. 2015; Korkmaz et al. 2019). However, there have been no reports regarding the effects of boron on wound tissues either topical or oral administrations as well as the wound tissue MDA levels that were significantly lower in OB and OLB groups than control group in this study. These findings are similar to the data with the above mentioned reports. It is suggested that boron positively increases the wound healing process due to inhibition of lipid peroxidation and removing free oxygen radicals causing the tissue damage in wound tissue.

It was reported that the wound tissue GSH levels were lower in the wounds compared to normal skin on days 2, 4, 7 and 14 in rats (Shukla et al. 1997). On the other hand, it was emphasized that wound tissue GSH peroxidase levels were higher in rats treated with curcumin than in the control group. Similarly, Musalmah et al. (2005) reported that vitamin E and α -tocopherol increased wound tissue GSH peroxidase enzyme levels in diabetic rats. It is stated that the intra-articular boron administration increases the cartilage tissue GSH level statistically significantly in the rats with an osteochondral defect (Korkmaz et al. 2019). In this study, it was determined that GSH level was higher especially in the OB and OLB groups than in other groups. In this study, it can be stated that boron probably helps to clean the free oxygen radicals in the damaged tissue, thus preventing the depletion of GSH and as a result helping to maintain the integrity of the cellular membranes in the wound tissue.

SOD and CAT are the basic antioxidant cellular defense system enzymes involved in the elimination of free oxygen radicals from the body and their

detoxification. CAT also prevents the tissue from highly reactive hydroxyl radicals by decomposing hydrogen peroxide into water and oxygen (Ince et al. 2010). In a study conducted on rats, wound tissue SOD and CAT levels are reported to be lower than those of normal skin tissue (Shukla et al. 1997). It is stated that the administration of vitamin E in rats increases the wound tissue SOD level (Musalmah et al. 2005), while curcumin application increases both wound tissue SOD and CAT levels (Panchatcharam et al. 2006). Korkmaz et al. (2019), reported that intra-articular boron administration increased the concentration of cartilage tissue SOD and catalase levels more in rats in which they created an osteochondral defect compared to the control group. In the present study, while the lowest wound tissue SOD level was observed in the control group, the highest SOD level was observed in the OLB and LB groups. Moreover, wound tissue CAT levels were determined to be higher in the LB, OB and OLB groups in comparison with the control group. In this respect, the fact that boron increases the levels of SOD and catalase that are antioxidant enzymes in the wound tissue shows that these two agents contribute to the antioxidant defense system. This study is the first study that evaluates the effects of orally and topically administered boron on both blood and wound tissue MDA, GSH, SOD and CAT levels in rats.

As a result, it can be said that oral administration of boron in addition to topical treatment contributes the wound healing due to the antioxidant property of boron in wound healing process.

ACKNOWLEDGEMENT

- *This publication was summarized from master thesis entitled "Comparison of the Effects of Orally and Locally-Administered Boron on Wound Healing and Oxidative Stress in Rats"*
- *This study was presented at 2nd International Veterinary Surgery Congress of Turkey, 20-23 September 2018, Lefkoşa, Cyprus.*
- *This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Afyon Kocatepe University (Project Number: 16.SAG.BIL.25)*

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Aebi HE. Catalase in vitro. In: Bergmeyer HU, editor. Methods of enzymatic analysis. New York: Academic Press, 1983; pp 673-677.

Beckert S, Königsrainer A, Coerper S. The physiology of wound healing. Therapeutische Umschau. Revue

therapeutique, 2007; 64(9): 467-472.

- Benderdour M, Hess K, Dzondo-Gadet M, Nabet P, Belleville F, Dousset B.** Boron modulates extracellular matrix and TNF α synthesis in human fibroblasts. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998; 246(3):746-751.
- Benderdour M, Hess K, Gadet MD, Dousset B, Nabet P, Belleville F.** Effect of boric acid solution on cartilage metabolism. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997; 234(1):263-268.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM.** Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. Clin. Med. 1963; 61(5): 882-8.
- Bleeh MF, Martin C, Borrelly J, Hartemann P.** Traitement des plaques profondes avec perte de substance; Interet d'une solution d'acide borique 3 %. Presse Medicale 1990a; 19:1050-1052.
- Bleeh MF, Martin C, Pichon M, Borrelly J, Hartemann P.** Clinical and bacteriologic course of wounds as a function of various protocols of local antiseptis. Rev. Chir. Orthop. 1990b; 76(1): 55-61.
- Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydın A, Eken A, Ozal E, Kuralay E, Demirkilic U, Tatar H.** Protective Effects of Antioxidant Medications on Limb Ischemia Reperfusion Injury. J. Surg. Res. 2007; 139(2): 274-9.
- Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Hazman O.** Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Drug Chem. Toxicol. 2015;38(4): 391-9.
- Değim Z, Çelebi N, Sayan H, Babül A, Erdoğan D, Take G.** An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation. Amino Acids. 2002; 22:187-198.
- Demirci S, Doğan A, Aydın S, Dülger EÇ, Şahin F.** Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression, and inflammation. Mol. Cell. Biochem. 2016; 417(1-2):119-133.
- Demirci S, Doğan A, Karakuş E, Halıcı Z, Topçu A, Demirci E, Şahin F.** Boron and Poloxamer (F68 and F127) Containing Hydrogel Formulation for Burn Wound Healing. Biol. Trace Elem. Res. 2015; 168:169-80.
- Draپر HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Methods Enzymol. 1990; 186: 421-31.
- Drabkin DL, Austin JH.** Spectrophotometric studies. II. Preparations from washed blood cells; nitric oxide, hemoglobin and sulfhemoglobin. J Biol Chem 1935; 112(1):51.
- Gultepe EE, Uyarlar C, Bayram İ.** Supplementation of Cr Methionine During Dry Period of Dairy Cows and Its Effect on Some Production and Biochemical Parameters During Early Lactation and on Immunity of Their Offspring. Biol. Trace Elem. Res. 2018; 186(1): 143-153.
- Luck H.** Catalase. In: Bergmeyer HU (ed). Methods in analysis. London: Academy Press. 1955.
- Ince S, Keles H, Erdogan M, Hazman O, Kucukkurt I.** Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. Drug Chem Toxicol. 2012; 35(3): 285-92.
- Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant

- activity, and DNA damage in rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2010; 24(3): 161–4.
- Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Acaroz DA, Akbel E, Cigerci IH.** Protective effects of boron on cyclophosphamide induced lipid peroxidation and genotoxicity in rats. *Chemosphere.* 2014; 108: 197-204.
- Murray F.** A Comparative Review of the Pharmacokinetics of Boric Acid in Rodents and Humans. *Biol. Trace Elem. Res.* 1998; 66:331-41.
- Kapan M, Mehmet S, Erdal SAK, Öngören AU.** Lokal Fenitoin ve Üre Uygulamasının Yara iyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması. *Yeni Tıp Dergisi*, 2008; 25(4):209-2012.
- Keast DH, Orsted H.** The basic principles of wound care. *Ostomy. Wound. Manage.* 1998; 44(8), 24-28.
- Korkmaz M, Turkmen R, Demirel HH, Saritas ZK.** Effect of Boron on the Repair of Osteochondral Defect and Oxidative Stress in Rats: an Experimental Study. *Biol. Trace Elem. Res.* 2019; 187(2):425-433.
- Kucukkurt I, Ince S, Demirel HH, Turkmen R, Akbel E, Celik Y.** The Effects of Boron on Arsenic-Induced Lipid Peroxidation and Antioxidant Status in Male and Female Rats. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2015; 29(12):564–71.
- Kuru R, Yarat A.** Bor ve Sağlığımıza Olan Etkilerine Güncel Bir Bakış. *Clin Exp Health Sci* 2017; 7:104-114.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193(1):265-75.
- Musalmah M, Nizrana MY, Fairuz AH, NoorAini AH, Azian AL, Gapor MT, Wan Ngah WZ.** Comparative effects of palm vitamin E and α -tocopherol on healing and wound tissue antioxidant enzyme levels in diabetic rats. *Lipids.* 2005; 40(6):575-580.
- Nzietchueng RM, Dousset B, Franck P, Benderdour M, Nabet P, Hess K.** Mechanisms implicated in the effects of boron on wound healing. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2002; 16(4): 239-244.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 1979; 95(2):351–8.
- Özler M, Şimşek K, Topal T, Öter Ş, Korkmaz A.** Pinealektomili ratlarda yara iyileşmesi. *Gulhane Med. J.* 2010; 52: 181-184.
- Panchatcharam M, Miriyala S, Gayathri VS, Suguna L.** Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol. Cell. Biochem.* 2006; 290(1-2): 87-96.
- Shukla A, Rasik AM, Patnaik GK.** Depletion of reduced glutathione, ascorbic acid, vitamin E and antioxidant defence enzymes in a healing cutaneous wound. *Free Radic. Res.* 1997; 26(2): 93-101.
- Singh S, Young A, McNaught CE.** The physiology of wound healing. *Surgery (Oxford)*, 2017; 35(9): 473-477.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin. Chem.* 1988; 34(3):497-500.
- Uçkun Z.** Esansiyel bir komponent: bor-borun günlük alımı ve fizyolojik etkileri. *J Turkish Sci. Rev.* 2013; 6: 119-23.
- Uyar A, Akyol T, Yaman T, Keleş ÖF.** Ratlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Yara Modelinde Civanperçemi (*Achillea millefolium*) Bitkisinin Yara İyileşmesi ve Oksidatif Stres Üzerine Etkisinin Histopatolojik ve Biyokimyasal Olarak Araştırılması. *Van Veterinary Journal*, 2017; 28(3):157-163.
- Werner S, Grose R.** Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol. Rev.* 2003;83(3): 835–70.
- Wilson JH, Ruszler PL.** Long term effects of boron on layer bone strength and production parameters. *Br. Poult. Sci.* 1998; 39(1): 11-15.
- Winterbourn CC, Hawkins RE, Brian M, Carrell RW.** The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* 1975;85: 337–41.

Investigation of *Listeria* spp. in Raw Cow and Water Buffalo Milks Sold in Sivas Province

Seyda ŞAHİN^{1*} Abdullah AYYILDIZ²

¹Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 58140 Sivas, Turkey

²Gürün District Directorate of Agriculture and Forestry, Department of Animal Health, 58800 Gürün Sivas, Turkey

ABSTRACT

Listeria spp. is widely found in nature and the species pose a risk to public health. Particularly foods obtained from animals (meat and meat products; milk and dairy products) pose a critical risk factor for the transmission of *Listeria* to humans. Therefore, in this study, the presence of *Listeria* spp. in raw cow (n=50) and water buffalo milks (n=50) that were sold in Sivas province was investigated by using ISO 11290-1 method. *Listeria* spp. isolation rate was found as 4% (4/100) in overall raw milk samples. The isolates obtained from raw milk samples were validated by using polymerase chain reaction (PCR). The *Listeria* spp. contamination rate of raw cow milk was determined as 2% (1/50) and this rate was 6% (3/50) in water buffalo milk. It was determined that *Listeria* spp. isolates from the raw cow milk was all *L. grayi*; for the isolates from raw water buffalo milks, the isolates were identified as *L. seeligeri* (n=2) and *L. grayi* (n=1) by PCR method. However, none of the milk samples was contaminated with *L. monocytogenes*. Consequently, a low proportion of raw cow and buffalo milk sold in Sivas province were contaminated with *Listeria* spp. Since the major *Listeria* specie that is causing disease in humans is the *L. monocytogenes*, it was observed that the raw milks sold in Sivas province have a slight risk for public health. However, regular monitoring is important for that matter.

Keywords: *Listeria* spp, Cow milk, Water Buffalo milk, PCR

Sivas İlinde Satılan Çiğ İnek ve Manda Sütlerinde *Listeria* spp. Varlığının Araştırılması

ÖZ

Listeria cinsi doğada yaygın olarak bulunmakta ve halk sağlığı yönünden risk oluşturan türleri içermektedir. *Listeria* türlerinin insanlara bulaşmasından özellikle hayvansal gıdalar (et ve et ürünleri, süt ve süt ürünleri) önem arz etmektedir. Bu nedenle, Sivas ilinde satılan çiğ inek (n=50) ve manda sütlerinde (n=50) *Listeria* spp. varlığı ISO 11290-1 yöntemi kullanılarak araştırılması çalışmanın ana amacını oluşturmaktadır. İncelenen 100 adet çiğ süt örneğinin %4'ünden (4/100) *Listeria* spp. izole edildi. Süt örneklerinden elde edilen izolatların polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile doğrulanması yapıldı. Çiğ inek sütlerinin *Listeria* spp. kontaminasyonu %2 (1/50) olarak belirlenirken, manda sütlerinde %6 (3/50) olarak saptandı. İnek sütünden izole edilen izolat PZR yöntemi ile *L. grayi* olarak tanımlanırken, manda sütlerinden elde edilen izolatların ise *L. seeligeri* (n=2) ve *L. grayi* (n=1) oldukları belirlendi. Ancak, süt örneklerinin hiçbirinde *L. monocytogenes* tespit edilmedi. Sonuç olarak, Sivas ilinde satılan çiğ inek ve manda süt örneklerinin düşük bir oranının *Listeria* spp. ile kontamine olduğu belirlendi. İnsanlarda hastalık oluşturan majör türün *L. monocytogenes* olması nedeni ile, Sivas ilinde satılan çiğ sütlerin bu bakteri yönünden halk sağlığı sorunu yaratması ihtimalinin düşük olduğu görülmüştür. Ancak, düzenli kontrollerin yapılması önem arz etmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Listeria* spp, İnek sütü, Manda sütü, PZR

To cite this article: Şahin S, Ayyıldız A. Investigation of *Listeria* spp. in Raw Cow and Water Buffalo Milks Sold in Sivas Province. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):19-24.

Submission: 12.11.2019 Accepted: 06.01.2020 Published Online: 27.01.2020

ORCID ID; SŞ: 0000-0002-8173-7818, AA: 0000-0002-8932-7565

*Corresponding author e-mail: seydashin@cumhuriyet.edu.tr

GİRİŞ

Gıda kaynaklı enfeksiyon ve intoksikasyonlarda dünya genelinde önemli bir artış gözlemlenmekte olup, bunda rol oynayan mikroorganizmalardan biri de *Listeria* cinsi içinde bulunan türlerdir (EFSA 2018). Son yıllarda yapılan taksonomik çalışmaların sonucu ile birlikte, *Listeria* cinsi 17 türü içermekte olup bunlar *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welchimeri*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*'dir ve *L. grayi*'dir (Barre ve ark. 2016). Bu türler içerisinde *L. monocytogenes* insan ve hayvanlarda ciddi sporadik enfeksiyon oluştururken *L. ivanovii*'nin ise sadece hayvanlarda enfeksiyon oluşturan patojen tür olduğu belirtilmektedir (Swaminathan ve ark. 2007). Son yıllarda immün yetmezliğe bağlı olarak insanlarda *L. ivanovii* ve *L. seeligeri*'nin de enfeksiyon oluşturduğu bildirilmiştir (Rocourt ve ark. 1987, Favaro ve ark. 2014). Ayrıca, non-enfeksiyöz olarak da bilinen *L. innocua*'nın da 62 yaşındaki bir kişide ölümcül enfeksiyon şekillendirdiği rapor edilmiştir (Perrin ve ark. 2003).

Fakültatif hücre içi bir mikroorganizma olan *L. monocytogenes* insan ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hamile bireylerde aborta neden olabileceği gibi, yeni doğanlar, immün yetmezliği olanlar ve yaşlılar gibi risk grubunda olan bireylerde meningoensefalit ve septisemi gibi ciddi sağlık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olabilirler (Reda ve ark. 2016). Özellikle risk grubunda olan bireylerde mortalite oranının ise %20-30 arasında değiştiği bildirilmektedir (Jamali ve ark. 2013).

Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi'nin (EFSA) 2018 yılında yayımlanmış olduğu son raporda *L. monocytogenes*'in gıda kaynaklı salgınlar arasında üst sıralarda yer aldığı, 2480 listeriozis vakasında mortalitenin %13.8 olduğu bildirilmektedir (EFSA 2018). Listeriozis insidansı ise 2017 yılında bir önceki yıla göre neredeyse aynı düzeyde olduğu 100,000 kişide 0.48 olarak bildirilmiştir (EFSA 2018).

Listeria türlerinin doğada yaygın olarak bulunması, düşük pH, düşük sıcaklık ve yüksek tuz konsantrasyonunda üreyebilmesi gıda kaynaklı enfeksiyonların kontrolünü güçleştirmektedir (Gandhi ve Chikindas 2007). *L. monocytogenes*'in insanlara bulaşmasında en önemli kaynağın kontamine gıdalar olduğu bilinmektedir (Dhama ve ark. 2015). Süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri, balık eti gibi hayvansal kökenli ve tüketime hazır gıdaların etkenin bulaşmasında önemli role sahip gıdalar olarak belirtilmiştir (Şireli ve ark. 2002, Ağaoglu ve Alemdar 2004, Dhama ve ark. 2015, Kurpas ve ark. 2018).

Süt ve süt ürünleri bebekler ve çocuklar başta olmak üzere, her yaş grubu için önemli bir protein ve

kalsiyum kaynağıdır (Ünlütürk 1998). Manda sütü de yağ, laktoz, protein, toplam kuru madde ve kalori miktarı bakımından yüksek bir besin maddesidir. Manda sütünde süt yağı miktarı fazla olduğundan beslenme fizyolojisi açısından değerli bir süt olarak kabul edilmektedir (Soysal 2006). Beslenmede vazgeçilemez öneme sahip olan sütün uygun olmayan koşullarda sağımı, nakliyesi, işlenmesi, muhafaza edilmesi ve satışa sunulması esnasında patojen mikroorganizmalar ile kontaminasyon meydana gelmekte ve bu kontaminasyon halk sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Lejeule ve Rajala-Schultz 2009, Aksoy ve ark. 2018).

Bu çalışma, Sivas ilinde satılan çiğ inek ve manda sütlerinde *Listeria* spp. varlığının araştırılması ve bulunan izolatların tür tayininin yapılması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Süt Örneklerinin Alınması: Bu çalışmada, Nisan-Haziran 2018 tarihleri arasında Sivas'ta satılan toplam 100 adet çiğ süt örneği (50 inek sütü ve 50 manda sütü) materyal olarak kullanıldı. Süt örnekleri, farklı satış yerlerinden, 1 litre olacak şekilde periyodik olarak satın alındı. Örnekler, steril şişelerde ve +4°C'de soğuk zincirde laboratuvara getirilerek, aynı gün analizlere başlandı.

***Listeria* spp. Kültür Tekniği ile İzolasyon ve İdentifikasyonu:** Süt örneklerinden aseptik koşullarda steril plastik torbalara 25'er ml alınarak, üzerine 225'er ml Half Fraser Broth (Merck 1.10398.0500) ilave edildi. Elde edilen homojenat ön zenginleştirme amacıyla 30°C'de 24 saat inkübe edildi. Ön zenginleştirme işlemi takiben kültürden 0.1 ml alınarak 10 ml Fraser Broth (Merck 1.10398.0500) içeren tüplere aktarılarak 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Selektif zenginleştirme kültüründen *Listeria* Chromogenic agar (Lab M, HAL010) ve PALCAM agar üzerine (Oxoid CM0877-SR0150E) ekimler yapıldı ve plaklar 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda *Listeria* Chromogenic agarda; turkuaz mavi ve etrafı zonlu kolonilerden, PALCAM agarda zeytin yeşili-gri renkli, bazen siyah merkezli ve siyah haleli 1.5-2 mm çaplı *Listeria* şüpheli kolonilerden 1-5 adet seçildi. *Listeria* şüpheli kolonilerden biyokimyasal testler yapılmak üzere, Tryptone Soya agara (TSA-YE Oxoid CM0131-YE katkı) geçildikten sonra plaklar 30°C'de 24 saat inkübe edildi. TSA-YE'de üreyen kolonilerden elde edilen izolatlar ileri analizler için %10'luk gliserinli buyyonda -20°C'de muhafaza edildi (ISO 11290-1:2004).

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tekniği DNA Ekstraksiyonu

İzolatların PZR ile analizinde kültür yöntemi ile cins düzeyinde *Listeria* şüpheli izolatlardan DNA

ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Bu amaçla, Jeyaletchumi ve ark. (2010) belirttiği metot bazı modifikasyonlar ile kullanıldı. İzolatların TSB (Oxoid CM0129) hazırlanan kültürlerinin her birinden mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplerin üzerine K tamponu ve 5 µl proteinaz K (Vivantis PC0712-100 mg) ilave edildi. Tüpler 56°C'de su banyosunda 2 saat inkübasyonun ardından proteinaz K'nın inaktivasyonu için 95°C'de su banyosunda 10 dakika süreyle bekletildi. Son olarak örnekler 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi ve PZR'de hedef DNA olarak kullanıldı.

PZR

Listeria spp. izolatlarının PZR ile doğrulanmasında Doumith ve ark. (2004) tarafından önerilen *prfA* gen sekansını oluşturan primer çifti kullanıldı. *Listeria* spp., pozitif olan örneklerin tür düzeyinde PCR ile analizinde ise *prfA*, *Oxidoreductase*, *lmo0333*, *scrA*, *namA* ve *lin0464* gen sekansını oluşturan primer çiftleri kullanıldı (Liu ve ark. 2003, D'Agostino ve ark. 2004, Liu ve ark. 2004, Ryu ve ark. 2013) (Tablo 1).

PZR amplifikasyonu için; toplam 50 µl'lik hacimde hazırlanan PZR karışımına; 5 µl 10X PZR Buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9.1) ve %0.1 Triton X-100) (Vivantis, ViBufferA), 5 µl 25 mM MgCl₂ (Vivantis, 50 mM), her bir deoxynucleotide triphosphattan 250 µM (Vivantis, NP2406 100mM), 1.25 U Taq DNA polimeraz enzimi (Vivantis, PL1202 500 U) ve her bir primer çiftinden 20 pmol (Biomatik, Canada) ve 5 µl DNA ekstraktı ilave edildi.

Listeria spp. ve *L. monocytogenes* için PZR amplifikasyon işlemi, termal cycler'da (Biorad-T100™ Thermal Cycler, USA) 94°C'de 3 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, 94°C'de 40 saniye denatürasyon, 53°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 45 saniye hibridizasyon aşaması, 72°C'de 7 dakika final DNA sentezi 35 döngü olarak gerçekleştirildi. Diğer *Listeria* spp. için ise 94°C'de 5 dk ön denatürasyon aşamasını takiben, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 60°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 30 saniye hibridizasyon aşaması, 72°C'de 5 dakika final DNA sentezi 35 döngü olarak gerçekleştirildi. Elde edilen PZR ürünlerinden 10 µl DNA örneği ve 5 µl yükleme boyası ile jel kuyucuklarına bırakıldı. %1.5'lik agaroz jelde (Vivantis LE Grade Agarose Gel) 110 Volt elektrik akımında 120 dk süre ile elektroforez işlemine tabi tutuldu. Ethidium bromide (10 mg/ml) (Merck, 1.11608.0030) ile 30 dakika süreyle boyandı. Sonuçlar Ultra Viole (UV) transilluminatöre (Vilber Lourmat Quantum ST4) taşınarak, oluşan spesifik bandlar DNA belirteç (Vivantis VC 100bp NL1403) ve pozitif kontrol (*L. monocytogenes* ATCC 7644) yardımıyla UV ışığı altında değerlendirildi (Doumith ve ark. 2004, Ryu ve ark. 2013).

BULGULAR

Bu çalışmada 100 adet çiğ süt örneğinin %4'ünün (4/100) *Listeria* spp. ile kontamine olduğu bulundu. Soyutlanan izolatların tür tayini sonucunda *L. grayi* (n=2; %2) ve *L. seeligeri* (n=2; %2) oldukları tespit edildi. İnek sütlerinin *Listeria* spp. kontaminasyon oranı %2 (1/50) olarak belirlenirken bu oran manda sütlerinde %6 (3/50) olarak saptandı (Tablo 2). İnek sütünden izole edilen izolat PZR yöntemi ile *L. grayi* olarak tanımlanırken, manda sütlerinden elde edilen izolatların ise *L. seeligeri* (n=2) ve *L. grayi* (n=1) oldukları belirlendi. Çiğ inek ve manda süt örneklerinin hiçbirinde *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua* ve *L. welshimeri* tespit edilmedi.

TARTIŞMA

Avrupa Birliği'nde onaylanan insan vakalarında rapor edilen ve bildirim yapılan zoonozlar arasında *L. monocytogenes* beşinci sırada yer almaktadır. Söz konusu vakalarda listeriyozisde %13.8 gibi yüksek seviyede bir ölüm oranı rapor edilmiştir (EFSA 2018). Süt ve süt ürünlerinde bulunması ise süt sektörü ve halk sağlığı üzerinde olumsuz etkiye neden olmaktadır (Tahoun ve ark. 2017). Türkiye'de çiğ sütlerde *Listeria* spp. kontaminasyonu yapılan bazı çalışmalarda %0-%18 arasında iken bu oran *L. monocytogenes* yönünden değerlendirildiğinde %0-%6 arasında değiştiği bildirilmiştir (Tablo 3). Çiğ süt örneklerinde *Listeria* spp. varlığını belirlemek için daha önce yapılan çalışmalarda Kalorey ve ark. (2008) Hindistan'da 2060 çiğ inek süt örneğinin %6.74'ünde *Listeria* spp. saptarken, bu oran İran'da %11.1 (Rahimi ve ark. 2010) ve Meksika'da %23 (Carlos ve ark. 2001) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada çiğ inek ve manda süt örneklerinden elde edilen *Listeria* spp. kontaminasyonu sırasıyla %2-%6 olarak bulundu. Çiğ sütteki *Listeria* kontaminasyon oranlarının coğrafyaya göre ve ülkelere göre farklılık göstermesi doğal olarak karşılanmalıdır. Çünkü, kontaminasyon yetiştirme tipine, beslenme farklılığına (özellikle silaj ile beslenme), sütün sağımı, depolaması ve taşıma farklılıklarına göre değişmesi beklenmektedir (Taşçı ve ark. 2010, Durmaz ve ark. 2015). Ayrıca, mevsimin *Listeria* spp. kontaminasyonu üzerinde etki ettiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin; Kalorey ve ark. (2008) çiğ inek süt örneklerinde mevsime (yaz, sonbahar, kış ve ilkbahar) göre *L. monocytogenes* oranını sırasıyla %5.28, %7.96, %4.17 ve %3.66 bulduklarını bildirmişlerdir. Konosonoka ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada geleneksel yetiştiricilik yapılan çiftliklerdeki yemlerin ilkbahar ve yaz mevsiminde *Listeria* spp. içermezken, kış ve sonbahar mevsiminde yemlerden bu etkenin izole edildiği bildirmiştir. Bu çalışmada *Listeria* spp. düşük bulunma sebebi mevsimsel ve beslenme ile ilişkili olabilir, ve ileriki çalışmalarda örneklemenin tüm yıl yapılması düşünülmektedir.

Aygun ve Pehlivanlar (2006) Antakya'da 47 çiğ süt örneğinin 1'inden *L. grayi* (%2.12), Acaröz ve ark. (2017) ise Afyon'da 200 adet çiğ manda ve inek süt örneğinin 4'ünden *L. seeligeri* (%2) izole ettiklerini belirtmişlerdir. Aksoy ve ark. (2018), Kars'tan toplanan 100 çiğ süt örneğinin 4'ünden *L. seeligeri* (%11.1) izole ettiklerini bildirmişlerdir. Rahimi ve ark. (2014) İran'da 34 çiğ manda sütü örneğinin 2'sinden *L. seeligeri* (%5.9) izole ettiklerini rapor etmişlerdir. Carlos ve ark. (2001) Meksika'da 1300 çiğ süt örneğinin 44'ünde *L. seeligeri* (%4) saptamışlardır. Bu çalışmada inek sütünden izole edilen izolatın *L. grayi*, manda sütlerinden elde edilen izolatların ise *L. seeligeri* ve *L. grayi* olduğu belirlendi. Bu sonuçlar doğrultusunda, bu çalışmadan elde edilen veriler ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile *Listeria* spp. varlığı yönünden karşılaştırıldığında uyum içerisinde bulundu (Aygün ve Pehlivanlar 2006; Acaröz ve ark. 2017). Çiğ inek ve manda süt örneklerinin hiçbirinde *L. monocytogenes* tespit edilmedi. Sığırlarda listeriozisin genellikle spoardik olduğu ve insidensinin düşük olduğu belirtilmektedir (Akça ve Şahin 2011). Nitekim Letonya'da yapılan bir çalışmada süt sığırlarının yemlerinde *Listeria* spp. kontaminasyonu %9.2 (n=12/130), *L. monocytogenes* kontaminasyonu ise %20 (n=26/130) olarak rapor edilmiştir. Farklı yem

örneklerinden *L. monocytogenes* izole edilmesine rağmen, alınan çiğ süt örneklerinde *L. monocytogenes*'in izole edilmediği bildirilmiştir (Konosonoka ve ark. 2012). *L. monocytogenes*'in bazı çevresel örneklerde uzun süre canlı kaldığı belirtilmektedir. Örneğin, nemli toprakta yaklaşık 497 gün, kuru toprakta >730 gün, sığır dışkısı 182-2190 gün (5°C), sıvı gübre (yaz) 36 gün, sıvı gübre (kış) 106 gün ve karışık hayvan yemlerinde 188-275 gün *L. monocytogenes*'in canlılığını sürdürdüğü rapor edilmiştir (Sauders ve Wideman 2007).

Sonuç olarak, Sivas ilinde tüketime sunulan çiğ inek ve manda süt örneklerinin düşük bir oranının *Listeria* spp. ile kontamine olduğu belirlendi. Buna ilaveten, analiz edilen süt örneklerinde *L. monocytogenes* bulunmaması, halk sağlığı açısından olumlu bir durumun göstergesi olarak yorumlanmalıdır. Ancak, yapılan bu çalışmadaki örnek sayısının düşük olması çalışmanın bir eksikliği olup, daha fazla örnek toplanarak, mevsimsel etkinin incelendiği yıl bazında ve beslemenin etkilerinin araştırılacağı tarama çalışmalarının yapılması farklı sonuçlar ortaya çıkarabilecektir.

Tablo 1. *Listeria* spp. ve *L.monocytogenes*'e Spesifik Primerler

Table 1. Primers Used for *Listeria* spp. and *L.monocytogenes*

Tür	Hedef gen	Primer Dizilimi (5'-3')	Büyükük (bp)	Kaynak
<i>Listeria</i> spp.	<i>prs</i>	F:GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG R:CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370	Doumith ve ark. (2004)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>prfA</i>	F:GATACAGAAACATCGGTGGC R:GTGTAATCTTGATGCCATCAGG	274	D'Agostino ve ark. (2004)
<i>L. grayi</i>	<i>Oxidoreductase</i>	F:GCGGATAAAGGTGTTCGGGTCAA R:ATTTGCTATCGTCCGAGGCTAGG	201	Ryu ve ark. (2013)
<i>L. seeligeri</i>	<i>lmo0333</i>	F:GTACCTGCTGGGAGTACATA R:CTGTCTCCATATCCGTACAG	673	Ryu ve ark. (2013)
<i>L. welshimeri</i>	<i>scrA</i>	F:CGTGGCACAATAGCAATCTG R:GACATGCCTGCTGAACTAGA	281	Ryu ve ark. (2013)
<i>L. innocua</i>	<i>namA</i>	F:CGCATTTATCGCCAAAACCTC R:TCGTGACATAGACGCGATTG	749	Liu ve ark, 2003
<i>L. ivanovii</i>	<i>lin0464</i>	F:CGAATTCCTTATTCACTTGAGC R:GGTGCTGCGAACTTAACTCA	463	Liu ve ark. 2004

Tablo 2. İnek ve Manda Süt Örneklerinde *Listeria* spp. Dağılımı

Table 2. Distribution of *Listeria* spp. in Cow and Water Buffalo Milk Samples

Örnek	Örnek sayısı (n)	Klasik kültür pozitif örnek sayısı	PZR Doğrulama						
			<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>
İnek Sütü	50	1	%2 (1/50)	-	%2 (1/50)	-	-	-	-
Manda Sütü	50	3	%6 (3/50)	-	%2 (1/50)	%4 (2/50)	-	-	-
Toplam	100	%4 (4/100)	%4 (4/100)	-	%2 (2/100)	%2 (2/100)	-	-	-

- Tespit edilmedi

Tablo 3. Türkiye’de Süt Örneklerinde Yapılan Çalışmalarda *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* Varlığı
Table 3. Occurrence of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in Milk Samples in Turkey

Yer	Örnek sayısı	Örnek türü	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	Kaynak
Sivas	100	Çiğ inek sütü	%6	%4	Vardar Ünlü ve ark. 1998
Van	250	Çiğ süt	%2.4	%1.2	Sağun ve ark. 2001
Batı Anadolu	100	Çiğ süt		%3	Soyutemiz ve ark. 2001
Tekirdağ, İstanbul ve Kırklareli	221	Çiğ süt		%0.45	Uysal ve Arıç 2003
Antakya	47	Çiğ süt	%2.12	-	Aygün ve Pehlivanlar 2006
İstanbul	350	Çiğ süt	%6.57	%0.57	Issa ve ark. 2010
İstanbul Trakya	300	Çiğ süt		%4	Dümen ve ark. 2011
Kars	250	İnek sütü		%0.8	Akça ve Şahin 2011
Kayseri	50	İnek sütü	-		Abay ve ark. 2012
	50	Tank sütü	-		
		Çiğ inek sütü		%2	
Van	140	Çiğ koyun sütü		%2.7	Duramaz ve ark. 2015
		Çiğ keçi sütü		-	
Samsun	100	Çiğ inek sütü	%12	%5	Kevenk ve Terzi Gülel 2016
Afyonkarahisar	100	Çiğ inek sütü	%4	-	Acaröz ve ark. 2017
	100	Çiğ manda sütü	%1	-	
Kars	100	Çiğ süt	%10	%6	Aksoy ve ark. 2018
Çanakkale	50	Çiğ süt	%18	%2	Şanlıbaba ve Uymaz Tezel 2018
Sivas	50	Çiğ inek sütü	%2	-	
	50	Çiğ manda sütü	%6	-	Bu çalışma

- Tespit edilmedi.

TEŞEKKÜR

► Bu çalışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) tarafından V-067 proje numarası ile desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abay S, Aydın F, Sümerkan AB. Molecular typing of *Listeria* spp. isolated from different sources. Ankara Üniv Vet Fak Derg. 2012; 59: 183-190.
- Acaröz U, Arslan-Acaröz D, Kara R, Zemheri F, Gürler Z. Afyonkarahisar ilinden toplanan manda ve inek sütlerinde *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi. Kocatepe Vet J. 2017; 10(4): 264-268.
- Ağaoğlu S, Alemdar S. Van'da tüketime sunulan dondurmalarda bazı patojenlerin varlığının araştırılması. YYÜ Vet Fak Derg. 2004; 15(1-2): 59-64.
- Akça D, Şahin M. Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal sıvı örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2011; 17(6): 987-993.
- Aksoy A, Sezer Ç, Vatansver L, Gülbaz G. Presence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2018; 24(3): 415-421.
- Aygün O, Pehlivanlar S. *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. Food Control. 2006; 17: 676-679.
- Barre L, Angelidis AS, Boussaid D, Brasseur ED, Manso E, Besse NG. Applicability of the EN ISO 11290-1 standard method for *Listeria monocytogenes* detection in presence of new *Listeria* species. Int J Food Microbiol. 2016; 238: 281-287.
- Carlos VS, Oscar RS, Irma QR. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. Food Microbiol. 2001; 18: 177-181.
- D'Agostino M, Wagner M, Vazquez-Boland JA, Kuchta T, Karpiskova R, Hoorfar J, Cook N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. J Food Protect. 2004; 67: 1646-1655.
- Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Shabbir MZ, Barbuddhe S, Malik SVS, Singh RK. *Listeriosis* in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: a comprehensive review. Vet Q. 2015; 35: 211-235.
- Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. J Clin Microbiol. 2004; 42(8): 3819-3822.

- Durmaz H, Avcı M, Aygün O.** The presence of *Listeria* species in corn silage and raw milk produced in southeast region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2015; 21: 41-44.
- Dümen E, Issa G, İkiz S, Bağcıgil F, Özgür Y, Kahraman T, Ergin S, Yeşil O.** Determining existence and antibiotic susceptibility status of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products, serological and molecular typing of the isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011; 17: 111-119.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2018).** <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2018.5500>. Accessed 25.06.2019.
- Favaro M, Sarmati L, Sancesario G, Fontana C.** First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etecept. *JMM Case Reports.* 2014; 1: 1-5.
- Gandhi M, Chikindas ML.** *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int J Food Microbiol.* 2007; 113(1): 1-15.
- Issa G, Kahraman T, Kahraman B.** Prevalence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 in raw milk. *J Fac Vet Med İstanbul Üniv.* 2010; 36 (1): 57-63.
- ISO 11290-1 (2004).** Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method. Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jamali H, Radmehr B, Thong KL.** Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control.* 2013; 34(1): 121-125.
- Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret SP, Son R, Farinazleen MG, Cheah YK.** Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int Food Res J.* 2010; 17: 1-11.
- Kalorey DR, Warke SR, Kurkure NV, Rawool DB, Barbuddhe SB.** *Listeria* species in bovine raw milk: A large survey of Central India. *Food Control.* 2008; 19(2): 109-112.
- Kevenk TO, Gülel Terzi G.** Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. *J Food Safety.* 2016; 36: 11-18.
- Konosonoka IH, Jemeljanovs A, Osmane B, Ikauniece D, Gulbe G.** Incidence of *Listeria* spp. in dairy cows feed and raw milk in Latvia. *ISRN Vet Sci.* 2012; 2012: 1-5.
- Kurpas M, Wiczorek K, Osek J.** Ready-to-eat meat products as a source of *Listeria monocytogenes*. *J Vet Res.* 2018; 62(1): 49-55.
- Lejeule JT, Rajala-Schultz P.** Unpasteurized milk: A continued public threat. *Food Safety.* 2009; 48: 93-100.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML.** Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiol Lett.* 2003; 223: 205e210.
- Liu D, Ainsworth AJ, Austin FW, Lawrence ML.** PCR detection of a putative N-acetylmuramidase gene from *Listeria ivanovii* facilitates its rapid identification. *Vet Microbiol.* 2004; 101: 83e89.
- Perrin M, Bemmer M, Delamare C.** Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 5308-5309.
- Rahimi E, Ameri M, Momtaz H.** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from milk and dairy products in Iran. *Food Control.* 2010; 21(11): 1448-1452.
- Rahimi E, Momtaz H, Behzadnia A, Baghbadorani ZT.** Incidence of *Listeria* species in bovine, ovine, caprine, camel and water buffalo milk using cultural method and the PCR assay. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014; 4: 50-53.
- Reda WW, Abdel-Moein K, Hegazi A, Mohamed Y, Abdel-Razik K.** *Listeria monocytogenes*: an emerging food-borne pathogen and its public health implications. *J Infect Dev Ctries.* 2016; 10(2): 149-154.
- Rocourt J, Schrettenbrunner A, Hof H, Espaze EP.** [New species of the genus *Listeria*: *Listeria seeligeri*]. *Pathol Biol (Paris).* 1987; 35(7): 1075-1080.
- Ryu J, Park SH, Yeom Y S, Shrivastava A, Lee SH, Kim YR, Kim HY.** Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. *Food Control.* 2013; 32: 659-664.
- Sağun E, Sancak YC, İşleyici Ö, Ekici K.** Van ve çevresi süt ve otlu peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma. *Turk J Vet Anim Sci.* 2001; 25: 15-19.
- Sauders BD, Wiedmann M.** Ecology of *Listeria* Species and *L. monocytogenes* in the Natural Environment. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety.* Ed; Ryser ET and Marth EH, CRC Press, Boca Raton, New York, US. 2007; pp. 21-44.
- Soysal İ.** Manda ve Ürünleri Üretimi. Tekirdağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü, Ders Notları. 2006; Tekirdağ.
- Soyutemiz E, Çetinkaya F, Özkan C, Gedikoğlu S.** Presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples from West Anatolia. *Turk J Infect.* 2001; 15(1): 5-9.
- Swaminathan B, Cabanes D, Zhang W, Cossart P.** *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, Ed; Doyle MP and Beuchat LR, 3rd Ed., American Society for Microbiology Press, Washington DC. 2007; pp. 457-491.
- Şanlıbaba P, Uymaz Tezel B.** Prevalence and characterization of *Listeria* species from raw milk and dairy products from Çanakkale Province. *Turkish J Agri Food Sci Tech.* 2018; 6: 61-64.
- Şireli UT, Erol İ, Şahin S, Terzi G, Gürbüz AO.** Prevalence and contamination levels of *Listeria* Spp. in poultry minced, poultry meatballs and poultry burgers. *Tr J Vet Anim Sci.* 2002; 26: 1271-1276.
- Taşçı F, Türütoğlu H, Öğütçü H.** Investigations of *Listeria* species in milk and silage produced in Burdur province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2010; 16: 93-97.
- Tahoun, ABMB, Abou Elez, RMM, Abdelfatah, EN, Elsohaby, I, El-Gedawy, AA, Elmoslemany, AM.** *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017; 10: 264-270.
- Uysal HK, Anđ Ö.** Süt ve süt ürünlerinden izole edilen *Listeria* türleri. *Turk Mikrobiyol Cem Derg.* 2003; 33: 163-169.
- Ünlütürk A.** Süt ve Süt Ürünlerinde Mikrobiyolojik Bozulmalar, Patojen Mikroorganizmalar ve Muhafaza Yöntemleri. In: *Gıda Mikrobiyolojisi*, Ed; Ünlütürk A, Turantaş F, Mengi Tan Basımevi, İzmir. 1998; s. 289-307.
- Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Bakıcı Z.** Incidence of *Listeria* spp. from raw milk in Sivas. *Tr J Medical Sci.* 1998; 28: 389-392.

Determination The Levels of Some Biochemical Parameters in Female Hair Goats in Cukurova Region

Cenk ER^{1*}, Mahmut OK²

¹Cukurova University, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary Internal Medicine Department, 01930, Adana, Turkey

²Selcuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary Internal Medicine Department, 42250, Konya, Turkey

ABSTRACT

This study aimed to determine the average value of some biochemical parameters of hair goats that are widely cultivated in Turkey. For this purpose, Alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), cholesterol, triglycerides, glucose, calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), urea (BUN), creatine (Cr), albumin (Alb), total protein (TP) and total bilirubin (T.Bil) measurements were made in peripheral blood which are collected from 133 healthy female hair goats. As a result of this study, some serum biochemistry parameters of female hair goats were determined for the first time and, the values obtained from the study were measured via IBM SPSS Statistics 22 program. It was revealed that there were differences between them and other goat breeds. It was also observed that some values may change due to altitude differences. The data obtained as the result of this study is important in terms of providing resources for the studies to be performed on hair goats. Besides, for the first time, it has been shown that altitude has an effect on some blood parameters in hair goats and it should be considered in future studies.

Keywords: Hair goat, Serum biochemistry, Altitude, Turkey

Çukurova Yöresi Dişi Kıl Keçilerinde Bazı Biyokimyasal Parametre Düzeylerinin Belirlenmesi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı; ülkemizde yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan kıl keçilerine ait bazı biyokimyasal parametrelerin ortalama değerini ortaya koymaktır. Bu amaçla 133 adet sağlıklı dişi melez kıl keçisinden toplanan perifer kanda Alkalen fosfataz (ALP), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), kolesterol, trigliserid, glikoz, kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), fosfor (P), üre (BUN), kreatin (Kr), albümin (Alb), total protein (TP) ve total bilirubin (T.Bil) ölçümleri yapıldı. Elde edilen değerler IBM SPSS 22 istatistik programı yardımıyla değerlendirildi. Çalışma sonucunda dişi melez kıl keçilerine ait bazı serum biyokimyası parametreleri ilk kez belirlenmiş ve diğer keçi ırklarıyla aralarında farklılıklar olduğu ortaya konmuştur. Ayrıca bazı değerlerde rakım farklılıklarına bağlı değişimlerin olabileceği de gözlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler kıl keçileri ilgili yapılacak çalışmalara kaynak sağlayabilmesi bakımından önemlidir. Ayrıca ilk kez bu çalışma ile kıl keçilerinde rakımın bazı kan parametreleri üzerine etkisi olduğu ve gelecekte yapılacak çalışmalarda göz önünde bulundurulması gerektiği ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: Kıl keçisi, Serum biyokimyası, Rakım, Türkiye

To cite this article: Er C. Ok M. Determination The Levels of Some Biochemical Parameters in Female Hair Goats in Cukurova Region. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):25-29.

Submission: 21.09.2019 Accepted: 22.01.2020 Published Online: 27.01.2020

ORCID ID; CE: 0000-0002-9980-6447, MO: 0000-0002-8210-6735

*Corresponding author e-mail: cenker@cu.edu.tr

INTRODUCTION

Goats are abstinent animals, because of that goat breeding is more intense in mountainous, arid and arable rural areas where land structure, climate, and vegetation are not suitable for husbandry and breeding of other species (Gupta et al. 2013). In our country which has different geographical and climatic characteristics, hair goat, mohair goat, Kilis goat, Saanen goat, and other crossbred goat breeds are widely cultivated today due to the suitability of the geographical structure of the region (İriadam 2004, Elitok 2012). According to the data of Turkey Statistical Institute 's, there are 10,634,672 goats in Turkey and this constitutes 17.6% of our total number of animals being. In the same year, 13603 tons of goat meat, 42489 tons of goat milk, 5796 tons of hair and 356 tons of mohair were produced in our country. (Anonymous 2017). Goat breeding is an important livestock breeding branch in the maquis and mountainous regions of Osmaniye, which is located in the eastern part of Çukurova region, where there is no suitable pasture structure and goat breeding is also carried out intensively in this region. The number of goats reared in Osmaniye province is 57.065 and most of them are hair goats that are adapted to the geographical and climatic conditions of the region (Anonymous 2017). The reason that goat is widely grown in the region is that it can evaluate shrubland and shrubland areas that cannot be evaluated by other farm animals (Şimşek et al. 2007).

To increase productivity and sustainability in goat breeding, modern production and breeding activities should be carried out in goat breeding areas. First of all, it is necessary to determine the hematological parameters and the requirements of the animal (Kataria et al. 2011, Pradhan 2016). Although many studies have been conducted in domestic animals for this purpose, farm animals and different goat breeds in our country, there is not enough data about hair goats and their race characteristics (İriadam 2004, Elitok 2012, Gürgöze and Gökalp 2018). Therefore, breeders and veterinarians in our country refer to the previous studies of researchers in other countries (İriadam 2004). Although these studies are of partial benefit, they remain inadequate because all other vital values, especially biochemical parameters, show significant differences according to climate, race, age, and gender (Gwaze et al. 2012). Some researchers have pointed out that because of that reason, it is not possible to determine a universal reference range in goats, hence reference values should be determined for each goat race living in different geographic areas in their own (Tibbo et al. 2008).

Biochemical parameters frequently used in goat breeding as in other types of animal husbandry are Alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase

(ALT), aspartate aminotransferase (AST) (Çimtay and Şahin 2000), gamma-glutamyltransferase (GGT) (Djuricic et al. 2011), cholesterol, triglycerides, glucose (Gupta et al. 2013), calcium (Ca), magnesium (Mg), phosphorus (P), urea (BUN), creatine (Kr), albumin (Alb), total protein (TP) and total bilirubin (T.Bil) (Mbassa and Poulsen 1993). Biochemical parameters of different goat breeds have been determined by many researchers before and the clinical usefulness of the values have been demonstrated (Pradhan 2016). The same parameters are used in the clinical diagnosis, determination and the course of effective treatment method, deciding treatment application and evaluation of the response to treatment in goats (Piccione et al. 2010).

The objective of this study is to contribute to resource creation by identifying the average ranges of some biochemical parameters belonging to hair goats, which are widely cultivated in our country, to contribute to the diagnosis of diseases, planning of treatment and follow up of the patient.

MATERIALS and METHODS

Permission of Research Application from the Ministry of Agriculture and Forest obtained at 20/03/2019, and Ethics Committee Report regarding to that permission obtained at 03/04/2019 from Local Ethic Committee of Cukurova University before the start of research. The material of the study consisted of 133 clinically healthy and 1 to 4 years old female hair goats in Osmaniye. The goats were divided into three groups as Group I (87 Altitude, n = 70), Group II (129 Altitude, n = 43) and Group III (756 Altitude, n = 20) according to the altitude of the area they are settled in. All of the animals were grazed in pasture and forest areas during the day, and in the evening they were fed with total mix ration which consists of soy straw, corn silage, peanut meal, and barley. All goats were clinically examined prior to blood collection. For this purpose, information was obtained from the owner about the history of the goat, and then the patient's general examination was performed respectively. Clinically healthy female hair goats with no recent history of the disease, and not given birth in the last six months were accepted in the study. Blood was collected from the vena jugularis in October and November, in order to eliminate the seasonal effect and during the daytime when they were in the volley, under the rules of asepsis and antisepsis. The collected blood was centrifuged at 3000 rpm for 10 min in the same day as described in the literature (Gürgöze and Gökalp 2018). Separated serum was kept at -20°C until analysis day (Daramola et al. 2005). Serum ALP, ALT, AST, GGT enzyme activities, BUN, Cr, TP, Alb, T. Bil, Cholesterol, Triglyceride and Glucose, Ca, Mg and P levels were measured by commercial kits via auto

analyzer (Brand: Abbott architect, version: C8000, USA).

Statistical Analysis

The values obtained from the study were measured via IBM SPSS Statistics 22 program. After determining the reference values with descriptive statistics, one-way analysis of variance (One Way ANOVA / Welch) was used to reveal the differences between the groups and Dunnett T3 test methods were used to test the source of the difference and confidence interval was accepted as 95% ($p < 0.05$). The reason to choose to this test method, instead of Duncan, was different sample values that each group contains as described in elsewhere (Weaver et al. 2017).

RESULTS

Some serum biochemistry levels belonging to hair goats are presented in Table 1 and the parameters of goats divided into three groups according to the altitude they are settled in are presented in Table 2.

As shown in Table 2, ALP levels of goats reared at low altitude were found to be significantly higher compared to groups raised at high altitude, on the contrary, AST levels increased significantly with elevation ($p < 0.05$). ALT activities, which is another liver enzyme, were decreased first and then increased again due to the increase in altitude and a similar effect has been detected in serum bilirubin levels vice versa. GGT enzyme, another parameter used in the diagnosis of hepatobiliary diseases, did not show any changes due to altitude differences.

BUN levels, a member of the kidney panels, decreased first and then increased together with altitude raise as there was no significant difference observed in Cr levels according to altitude changes. Total protein and albumin levels were not affected by altitude differences also. Cholesterol and triglyceride levels decreased continuously due to the increase in altitude, whereas glucose levels, on the contrary, showed a steady and significant increase with increasing altitude. Phosphorus level decreased significantly due to the increase in altitude, while there were no significant differences in Ca and Mg levels.

DISCUSSIONS

Some hematological values of different goat breeds raised in our country have previously been put forward by some researchers (İriadam 2004, Elitok 2012, Gürgöze and Gökalp 2018). Determination of levels of some biochemical values belonging to hair goats, which constitute the majority of the goat population in our country and which have an important place especially in the livelihood of the mountain villagers, has been one of the important

gains of this study. The sample size in our study is higher than the previous studies performed in Turkey for the same purpose. While 94 goats were used in a study conducted on Ankara and Aleppo goats in 2018 (Gürgöze and Gökalp 2018), 72 goats and kids were used totally in a study on Saanen goats in 2012 (Elitok 2012). In another study, the number of adult goats was 95 (İriadam 2004). In this respect, our study is in the first place among the studies carried out so far in our country in terms of sample size.

In previous studies about changes in serum levels of biochemistry parameters of goats, race, gender, age, season, sexual cycle, geographical area and feeding have been reported to have significant effects on these parameters (Mbassa et Poulsen 1993, Kataria et al. 2011, Gwaze et al. 2012, Gürgöze and Gökalp 2018). When the results of our study were compared with the previous studies of adult female goats in our country, ALP, AST, BUN, Total Protein, Cholesterol, Glucose and P values were found to be different from adult Ankara and Aleppo goat breeds (Gürgöze and Gökalp 2018). The differences in ALP, ALT, AST, BUN and cholesterol levels obtained from the previous study of adult Saanen breed female goats may suggest that goat species and geography may be effective in blood parameters (Elitok 2012). After the comparisons and considerations of the previous publications, it seemed necessary to determine the blood biochemical parameters of each breed separately and to take into consideration the race intervals when evaluating the biochemical parameters. Although the geographic region where the goats are raised is the same, the effect of altitude differences on the biochemical parameters of the goats has been demonstrated for the first time in this study. In the present study, it was shown that some serum biochemistry parameters especially ALP and ALT activities were affected by altitude differences (Table 2). Previous studies on liver enzyme levels in goats revealed the effect of season, sex, race and sexual cycle on enzyme activities (Tibbo et al. 2008, Pradhan 2016, Allaoua and Mahdi 2018). In this study, it was thought that altitude differences may have an effect on liver enzyme levels in goats and this situation should be taken into consideration during clinical evaluation. Although there is a significant difference in ALT, another liver enzyme, this change is similar to the change seen in BUN level, and although the altitude increases, enzyme levels return to their previous values after a certain elevation. Therefore it was evaluated that the changes seen in ALT and BUN parameters may not be caused by altitude differences alone.

Cholesterol, triglyceride and glucose levels, which are frequently used together for the evaluation of fat metabolism, diabetes mellitus, endocrine disorders, and other system functions, were also significantly affected by altitude differences as shown in Table 2.

Cholesterol and triglyceride levels were decreased as the altitude increased in accordance with each other and maintained this level after a certain altitude. Glucose levels increased due to the increase in altitude and maintained this level after a certain altitude. According to the results obtained in the present study, the change in cholesterol and triglyceride levels is in the same direction, whereas the change in glucose level is in the opposite direction. This finding is consistent with previous studies (Waziri et al. 2010). As a result, it was concluded that changes in triglyceride, cholesterol, and glucose levels are compatible with each other and altitude differences should be taken into consideration while evaluating these parameters together.

In our study, it was observed that the only mineral level affected by altitude differences was P and that the blood P level did not change to a certain altitude but it decreased significantly as the altitude continued to increase (Table 2). Previous studies performed in goats showed that Ca, Mg and P minerals were compatible with the changes in each parameter (Yatoo et al. 2013). However, in this study, it was suggested that only the change of P level and the absence of the expected change in Ca and Mg levels related to P could be affected by the altitude differences of the endocrine system and that future studies may investigate the alterations of endocrine system functions in terms of altitude differences.

Table 1. Mean values of serum biochemical parameters of female hair goats obtained in the study.

Parameters	Mean Values (Mean±SD)
ALP (U/L)	80,49±56,21
AST (U/L)	67,32±26,83
ALT (U/L)	18,41±5,34
GGT (U/L)	43,38±17,16
BUN (mg/dL)	24,23±10,81
Creatine (mg/dL)	0,56±0,21
TP (g/dL)	5,61±1,82
Albumin (g/dL)	2,16±0,69
T. Bil (mg/dL)	0,06±0,04
Cholesterol (mg/dL)	78,22±34,36
Triglycerid (mg/dL)	27,08±14,21
Glikoz (mg/dL)	30,00±10,25
Ca (mg/dL)	7,77±1,89
Mg (mg/dL)	2,18±0,64
P (mg/dL)	4,63±1,52

Table 2. Variation of parameters according to altitude differences

Parameters	Grup I (n = 70)	Grup II (n = 43)	Grup III (n = 20)	F Value	P Value
ALP (U/L)	99,00±57,39 a	60,93±47,18 b	57,75±48,94 b	9,01***	< 0,001
AST (U/L)	63,20±19,95 b	63,37±24,58 b	92,35±37,98 a	11,97***	<0,001
ALT (U/L)	19,96±4,79 a	15,35±3,85 b	19,55±7,12 a	12,22***	<0,001
GGT (U/L)	44,97±14,28	42,05±21,74	40,65±15,43	0,68 (-)	0,508
BUN (mg/dL)	28,63±12,37 a	17,14±3,47 b	24,10±6,70 a	19,18***	<0,001
Creatine (mg/dL)	0,57±0,26	0,57±0,15	0,55±0,12	0,06 (-)	0,946
TP (g/dL)	5,82±1,67	5,21±1,98	5,74±1,89	1,58 (-)	0,210
Albumin (g/dL)	2,27±0,63	2,07±0,76	2,01±0,71	1,75 (-)	0,177
T. Bil (mg/dL)	0,48±0,40 b	0,72±0,40 a	0,51±0,45 ab	4,69*	0,011
Cholesterol(mg/dL)	90,69±35,26 a	67,21±29,54 b	58,25±22,14 b	11,87***	<0,001
Triglycerides(mg/dL)	32,70±16,00 a	21,84±9,23 b	18,65±5,62 b	14,33***	<0,001
Glucose (mg/dL)	25,53±8,75 b	34,70±10,05 a	35,55±8,53 a	17,65***	<0,001
Ca (mg/dL)	7,99±1,65	7,57±2,20	7,42±1,95	1,04 (-)	0,356
Mg (mg/dL)	2,22±0,62	2,09±0,69	2,21±0,58	0,52 (-)	0,595
P (mg/dL)	4,85±1,64 a	4,64±1,17 ab	3,84±1,54 b	3,53*	0,03

a, b : Differences between groups carrying different letters on the same line are important

*: p<0,05

** : p<0,01

***: p<0,001

(-): Insignificant

CONCLUSIONS

As a result, biochemical parameter levels in healthy female hybrid hair goats were determined for the first time in our country. These parameters are very important in terms of reference to future studies related to hair goats. Besides, for the first time, the effect of altitude on biochemical parameters in hair goats has been demonstrated and it is also recommended to consider it in future studies.

ACKNOWLEDGEMENT

➤ *Cukurova University Department of Scientific Research Projects (BAP). Project number: 11966.*

➤ *Official permission letters are added to attachment which received from the Ministry of Agriculture and Forestry, and Local Ethics Committee, indicating that Ethics Committee permission is not required.*

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Allaoua SA, Mahdi D. Plasma biochemical and minerals parameters in Arbia goats of a semi-arid region of North-Eastern Algeria during different stages of production. *Veterinarski Arhiv*, 2018; 88 (5): 643-660. doi: 10.24099/vet.arhiv.0068
- Çimtay İ, Şahin T. Sığırların kan plazmasındaki bazı biyokimyasal parametreler üzerinde yaşın etkileri. *Y.Y.Ü. Vet. Fak. Derg.* 2000; 11 (1): 74-78.
- Daramola JO, Adeloya AA, Fatoba TA, Soladoye AO. Hematological and biochemical parameters of West African Dwarf Goats. *Livestock Research for Rural Development*. 2005; 17 (8): 1-7.
- Djuricic D, Dobranic T, Grizelj J, Gracner D, Harapin I, Stanin D, Folnozic I, Getz I, Cvitkovic D, Samardzija M. Concentrations of Total Proteins and Albumins, and AST, AP, CK and GGT Activities in the Blood Serum Boer and Saanen Goats During Puerperium. *Reprod Dom Anim* 2011; 46: 674–677.
- Şimşek ÜG, Bayraktar M, Gürses M. Saanen X Kıl Keçisi F1 ve G1 Melezlerinde Büyüme ve Yaşama Gücü Özelliklerinin Araştırılması. *F.Ü. Sağ. Bil. Derg.* 2007; 21 (1): 21-26.
- Gupta M, Kumar S, Dangi SS, Jangir BL. Physiological, Biochemical and Molecular Responses to Thermal Stress in Goats. *International Journal of Livestock Research*. 2013; 3 (2): 27-38.
- İriadam M. Kilis Keçilerine Ait Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.* 2004; 51: 83-85.
- Elitok B. Reference Values for Hematological and Biochemical Parameters in Saanen Goats Breeding in Afyonkarahisar Province. *Kocatepe Vet J.* 2012; 5 (1): 7-11.
- Kataria N, Kataria AK, Chaturvedi M, Sharma A. Changes in Serum Enzymes Levels Associated with Liver Functions in Stressed Marwari Goat. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2011; 7 (1): 14-19.

Pradhan BC. Evaluation of hematological and biochemical parameters of goats of central Odisha environment fed on natural grazing land of Odisha, India. *The Pharma Innovation Journal*. 2016; 5 (5): 83-90.

Gwaze FR, Chimonyo M, Dzama K. Effect of season and age on blood minerals, liver enzyme levels, and fecal egg counts in Nguni goats of South Africa. *Czech J. Anim. Sci.* 2012; 57 (10): 443–453.

Tibbo M, Jibril Y, Woldemeskel M, Dawo F, Aragaw K, Rege JEO. Serum enzymes levels and influencing factors in three indigenous Ethiopian goat breeds. *Trop Anim Health Prod.* 2008; 40: 657–666.

Mbassa GK, Poulsen JSD. Reference ranges for clinical chemical values in Landrace goats. *Small Ruminant Research*, 1993; 10 (2): 133-142.

Piccione G, Casella S, Lutri L, Vazzana I, Ferrantelli V, Caola G. Reference values for some haematological, haematochemical, and electrophoretic parameters in the Girgentana goat. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2010; 34 (2): 197-204.

Anonymus. Turkish Statistical Institute Databases. Hayvancılık İstatistikleri. 2017. Web address: www.tuik.gov.tr. The last date of access: 05.03.2019

Gürgöze S, Gökalp E. Şanhurfa Yöresi Ankara Tiftik ve Halep Keçi Irklarına Ait Bazı Biyokimyasal Kan Parametreleri ile Malondialdehit Düzeylerinin Tespiti. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Özel Sayı*. 2018; 19-23.

Yattoo MI, Saxena A, Kumar P, Gugjoo MB, Dimri U, Sharma MC, Jhambh R. Evaluation of serum mineral status and hormone profile in goats and some of their inter-relations. *Vet World*. 2013; 6 (6): 318-320. DOI: 10.5455/vetworld.2013.318-320.

Weaver KF, Morales V, Dunn SL, Godde K, Weaver PF. Parametric versus nonparametric tests, in: *An Introduction to Statistical Analysis in Research: With Applications in the Biological and Life Sciences*, 1st edition, Chapter (4), John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA. 2017; pp. 191–194.

Waziri MA, Ribadu AY, Sivachelvan N. Changes in the serum proteins, hematological and some serum biochemical profiles in the gestation period in the Sahel goats. *Veterinarski Arhiv*, 2010; 80 (2): 215-224.

Some Quality Properties of Malt Vinegars Produced with Different Germination Periods

Oktay TOMAR^{1*}, Gökhan AKARCA², Abdullah ÇAĞLAR¹

¹Kocaeli University, Faculty of Agriculture and Natural Science, Arslanbey Campus, 41285, Kocaeli, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 03200, Afyonkarabisar, Turkey

ABSTRACT

In this study; some quality properties of three different malt vinegars produced with different germination periods than winter barley malts were determined. Dry matter, acidity, brix, ash, conductivity and density values of malt vinegar samples were found to be higher than the samples dried after the germination ($P<0.05$). However, it was determined that pH, alcohol, antioxidant capacity and total phenolic content values were lower ($P<0.05$). The highest values in terms of brix (%) and alcohol (%) (5.7% and 0.025%) were determined in the malt vinegar samples obtained after germination for 12 days (CM12). Conductivity (mS/cm) and density (g/cm³) values increased during the germination period ($P<0.05$). The highest antioxidant capacity and total phenolic contents of three different malt vinegar samples were 1.15 µg TE/mL and 690.30 mg GAE/L in malt vinegar samples, respectively. L* and b* values decreased during the germination period ($P<0.05$), however a* value increased ($P<0.05$). In terms of mineral contents, the highest Na, Mg, B and S values were found in malt vinegar samples. The highest K, P, Ca, Mn values were determined in CM12. The highest Fe, Zn values were determined in CM7. In terms of color, aroma, smell, appearance and general appreciation scores, the highest appreciation scores were obtained from CM7 ($P<0.05$).

Keywords: Barley, malt, vinegar, quality characteristics.

Farklı Çimlendirme Süreleriyle Üretilen Malt Sirkelerin Bazı Kalite Özellikleri

ÖZ

Bu çalışmada; kışlık arpalık maltlardan farklı çimlendirme süreleriyle üretilmiş üç farklı malt sirkесinin bazı kalite özellikleri belirlenmiştir. Sirke örneklerinin kuru madde, asitlik, briks, kül, iletkenlik ve yoğunluk değerleri malt sirkесi örneğine kıyasla, çimlendirildikten sonra kurutulan örneklerde daha yüksek olduğu ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Buna karşın; pH, alkol, antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarlarının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$). Briks (%) ve alkol (%) miktarları bakımından en yüksek değerlerin (%5.7 ve %0.025) 12 gün çimlendirildikten sonra elde edilen malt sirkесi örneklerine (CM12) ait olduğu, iletkenlik (mS/cm) ve yoğunluk (g/cm³) değerlerinin ise, çimlendirme süresi boyunca artış gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Üretilen 3 farklı malt sirkесi numunelerinde en yüksek antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarlarının 1.15 µg TE/mL ve 690.30 mg GAE/L ile malt sirkесi örneğinde olduğu, L* ve b* değerlerinin çimlendirme süresi boyunca azalış gösterdiği ($P<0.05$); buna karşın a* değerinin ise artış gösterdiği ($P<0.05$) tespit edilmiştir. Mineral bakımından en yüksek Na, Mg, B ve S değerleri malt sirkесi, K, P, Ca, Mn değerleri, CM12 ve Fe, Zn değerleri ise CM7 örneklerinde belirlenmiştir. Renk, aroma, koku, görünüş ve genel beğeni kriterleri açısından en yüksek beğeni puanlarını CM7 örneklerinin aldığı görülmüştür ($P<0.05$).

Anahtar Kelimeler: Arpa, malt, sirke, kalite özellikleri.

To cite this article: Tomar O, Akarca G, Çağlar A. Some Quality Properties of Malt Vinegars Produced with Different Germination Periods. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):30-37.

Submission: 24.11.2019 Accepted: 27.01.2020 Published Online: 10.02.2020

ORCID ID; OT: 0000-0001-5761-7157, GA: 0000-0002-5055-2722, AÇ: 0000-0002-9716-8795

*Corresponding author e-mail: oktaytomar@hotmail.com

GİRİŞ

Sirke, ana hammadde karbonhidratlar olan, tüm Dünyada lezzet artırıcı ve doğal gıda koruyucusu olarak kullanılan önemli bir gıda maddesidir. Sirkenin ana bileşeni %4 ile %8 arasında değişen konsantrasyonla asetik asittir (Johnston ve Gass 2006).

Sirke oluşumunda ilk olarak oluşan döngüsel reaksiyonlarda fermente olabilecek özellikte şekerlerin alkole dönüşümü gerçekleşmektedir. Ardından bu tepkime ile elde edilen etanol oksidasyona uğramakta ve asetik asit oluşmaktadır (Treck ve Teuber 2002).

Sirke, genellikle üzüm, elma, pirinç ve buğday gibi çeşitli malzemelerden farklı yöntemlerle üretilen bir ürün olup, küfler, mayalar, laktik asit bakterileri ve asetik asit bakterileri dahil olmak üzere birçok mikroorganizma tarafından gerçekleştirilen bir dizi fermantasyon işlemi ile üretilmektedir (Plessi 2003). Bu organizmalar sadece asetik asit değil, aynı zamanda ürünün tadını ve aromasını değiştiren çeşitli metabolik bileşikler de üretirler (Rainieri ve Zambonelli 2009).

Sirke, genellikle sofralık olarak tüketilmesine karşın, sindirime yardımcı olmak, iştahı artırmak ve fiziksel yorgunluğu gidermek gibi fizyolojik etkileri nedeniyle de tüketilmektedir. Ayrıca sirke, uzun süredir antienfektif, kardiyovasküler-koruyucu, antitümör ve kan şekeri düşürücü etkileri olan birçok rahatsızlıklara karşı da kullanılmaktadır (Giudici ve ark. 2009, Murooka ve ark. 2009).

Malt, tahılların belli şartlarda su alarak çimlendirilmesi, ardından kavrulması ile elde edilen bir üründür (Anonim 2015). Maltlama, hidrolitik enzimlerin sentezlendiği çimlendirme işlemi sonucunda hücre çeperleri, proteinler ve nişastanın parçalanması sonucunda, tahılları daha gevrek hale getiren kontrollü bir çimlendirme işlemidir (Enari ve Sopanen 1986, Bamforth ve Barclay 1993, Celus ve ark. 2006). Genellikle arpaya uygulanan bir işlem olmasına karşın tüm tahıllar malt haline dönüştürülebilir (MacGregor ve Bhatti 1993).

Son yıllarda arpa, içerdiği bazı biyoaktif bileşiklerinin fonksiyonel özellikleri nedeniyle popülerlik kazanmıştır (Madhujith ve Shahidi 2007). Arpa maltı amino asit yönünden son derece zengin olup, esansiyel amino asitler dahil on sekiz amino asit içermektedir (Bonoli ve ark. 2004). Ayrıca K, Ca, Fe, Zn ve Mg gibi mineraller (Quinde ve ark. 2004) ile B vitamini açısından da değerli bir üründür. Ek olarak arpa maltı aktif enzimler açısından da önemli bir kaynak olarak değerlendirilmektedir (Han ve ark. 2009).

Yapılan çalışmalar arpa maltının insan sağlığı üzerinde de son derece faydalı etkileri olduğunu ortaya

koymaktadır. Antioksidan yapısı yüksek ve iltihaplı ve yaraları tedavi edici nitelikte olan klorofil yapısında bulunduran arpa maltı kırmızı kan hücrelerinin ihtiyacı olan oksijenin aktifliğini sağlamaktadır (Goupy ve ark. 1999). Ayrıca kabızlığı önlemede (Faivre ve ark. 1999), kan kolesterolünü düşürme ve kontrol altında tutmada (Frost ve ark. 1999) ve diyabet tedavisi (Gallaher ve ark. 1993) gibi daha pek çok alanda yararlı etkileri bulunmaktadır.

Bu çalışmada, ekimi en çok yapılan tahıl ürünlerinden biri olan arpanın, malt haline getirildikten sonra yeni bir kullanım alanı olarak doğal sirke üretiminde kullanılabilirliği ve bu sirkenin, çeşitli kalite özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Materyal

Bu çalışmada su tutma kapasitesi yüksek, malt üretimi için uygun Zeynel Ağa türü 2 sıralı arpalar (*Hordeum vulgare conv. Distichon*) kullanılmıştır. Arpalar Afyonkarahisar ilinde faaliyet gösteren özel bir firmadan temin edilmiştir.

Metot

Arpaların Malt Haline Getirilmesi ve Çimlendirilmesi

Malt üretilecek 5 kg arpa 10 °C'deki su ile 60 saat süre ile su oranı %43'e ulaşana kadar ıslatıldıktan sonra, 60 °C'de etüvde (Ecocel, MMM, Almanya) 2 saat süre ile su içeriği %8'e düşünceye kadar kurutulmuştur. Çimlendirme işlemi ise, topraksız ekim ile yapılmış olup, toplam 12 gün sürmüştür. Ekimi yapılacak arpalar 24 saat su içinde bekletilip, temizlendikten sonra ekilmiştir. 10 kg arpa ekilerek, günde iki defa damlama şeklinde 10 °C'de su ile sulama işlemi uygulanmıştır. Çimlendirme işleminin 7. ve 12. günlerinde arpalar ve çim kısımları ile birlikte toplanıp 60 °C'de etüvde (Ecocel, MMM, Almanya) 2 saat süre ile su içeriği %8'e düşünceye kadar, sürekli karıştırılarak kavrulmuştur.

Sirke Üretimi

Öncelikle malt ve çimlendirilmiş arpa örneklerinden (arpa+çim kısmı) ayrı ayrı 720'şer g alınarak kavanoza (5 litrelik) 1/3'ü oranında ilave edilmiştir. Üzerine doğal fermantasyon işleminin gerçekleşebilmesi için 50 g bal (Özkovan, Türkiye) ilave edilmiştir. Ayrıca doğal yolla üretilmiş fermente üzüm sirkesinden 150 mL ile 50 g nohut ilave edilerek fermantasyon şartlarının oluşması sağlanmıştır. Ürünlerin üzerine 5 litreye tamamlayacak şekilde su ilave edilmiştir. Hazırlanan kavanozların ağız kısımları hava girişini engellemeyecek kalınlıkta bez ile kapatılmış ve numuneler karanlık bir yerde laboratuvar ortamında bekletilmiştir. Bu süre boyunca örneklerin ağızları haftada iki defa açılarak, yeterli oranda hava alması amacıyla karıştırma işlemi yapılmıştır. Örnekler; yüzeylerinde sirke anası meydana gelinceye kadar 28

gün süre ile bekletildikten sonra, sirke anası, tortu ve oluşan sirke süzme işlemi ile birbirinden ayrılmıştır.

Hammadde ve Sirke Analizleri

Sirke üretiminde kullanılan malt örneklerine mineral madde, toplam fenolik madde, antioksidan aktivite, pH, suda çözünür kuru madde (Briks), toplam asitlik (titrasyon asitliği), renk, toplam kuru madde ve kül miktarı analizleri, sirke örneklerine ise; bu analizlere ilaveten yoğunluk, iletkenlik (kondüktivite) değerleri, alkol miktarı ile duyu analizi değerlendirilmiştir.

Örneklerin mineral madde içerikleri; Fu ve ark. (2013) da belirttiği şekilde ICP-OES (Plasma Quant PQ 9000) kullanılarak belirlenmiştir. Toplam fenolik madde miktarı, Folin-Ciocalteu yöntemine ile tespit edilmiş ve absorbans değerleri spektrofotometre ile (Shimadzu UV-1208, Japonya) belirlenerek hesaplanmıştır (Chu ve Chen 2006). Ham madde ve sirke örneklerinin antioksidan aktivite tayininde ise, Pinsiroadom ve ark. (2008) tarafından kullanılmış olan yöntemden yararlanılmıştır. Numunelerinin pH değerleri, Hanna (HI 2215, Almanya) ile AOAC (2000)'e göre, suda çözünen kuru madde miktarları Kırcı ve ark. (2007)'a uygun olarak Atago PAL1 (Pocet Refractometer, Japonya) dijital refraktometre ile belirlenmiş olup, kuru madde miktarları ise etüv (Ecocell 55, Almanya) kullanılarak tespit edilmiştir (AOAC 2000). Hammadde ve sirke örneklerinin renk değerleri ise; renk tayin cihazı (Konika Minolta, Chroma meter CR-400, Japonya) ile CIE LAB sistemi kullanılarak ölçülmüş ve sonuçlar L* (100: beyaz, 0: siyah), a* (+: kırmızı, -: yeşil) ve b* (+: sarı, -: mavi) olarak verilmiştir (Rommel ve ark. 1990). Örneklerin toplam asit miktarları Ünal (2007)'e göre; kül içerikleri ise AOAC (2000)'e göre Elektromag (M 1811, Türkiye) kül fırınında tespit edilmiştir. Sirke örneklerinin yoğunluk tayini Alak (2015)'e ve iletkenlik (kondüktivite) değerleri, el tipi kondüktivite (Sension 5Hach, CO, ABD) yardımıyla Cemeroğlu (2007)'na göre belirlenmiştir. Sirke örneklerinin alkol içerikleri, alkolimetre (AOAC 2000) ve son ürün duyu analizi skorları Altuğ ve Elmacı (2005)'e göre hesaplanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Bu araştırma çift tekerrürlü olarak yapılmış ve her tekerrür için de iki paralel kullanılmıştır. Araştırmada elde edilen sonuçlar SPSS V 23.0.0.0 istatistik paket programı kullanılarak hesaplanmıştır (Anonymous 2015). Sirke örneklerinin analizlerinden elde edilen veriler şansa bağlı blokları deneme planında varyans analizi tekniği uygulanarak değerlendirilmiştir. Farklılık görülen gruplarda ise farklılığın hangi düzeyde olduğu Duncan testi ile ($P<0.05$) belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sirke üretiminde kullanılan malt ile 7 ve 12 gün süre boyunca çimlendirildikten sonra kavru olarak elde edilen malt örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Örneklerin titrasyon asitliği, antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde değerlerinin çimlendirme süresi ile azalış gösterdiği ($P<0.05$), buna karşın kuru madde, kül miktarı ve briks derecesinin ise artış gösterdiği ($P<0.05$) belirlenmiştir. Kuru madde, briks ve kül miktarları en yüksek olan örneklerin 12 gün süre ile çimlendirilip kavrulmuş örnekler, pH, ve antioksidan kapasitesi değerleri en yüksek örneklerin 12 gün süre ile çimlendirilip kavrulmuş örnekler ve titrasyon asitliği ile toplam fenolik madde miktarları bakımından en yüksek değerlerin ise; malt örneklerinde olduğu belirlenmiştir (Tablo 1).

Sirke yapımında kullanılan hammaddeler mineral içerikleri açısından incelendiğinde; Mg, B ve S'ün çimlendirme süresi ile azalış gösterdiği ($P<0.05$); buna karşın K, Fe, Ca ve Mn'un artış gösterdiği ($P<0.05$) belirlenmiştir (Tablo 2). Na, P, Fe, Zn içerikleri en yüksek 7 gün çimlendirilip ve kavrulmuş malt örneklerinde, Mg, B, S içerikleri en yüksek malt ve K, Ca, Mn içerikleri en yüksek ise 12 gün çimlendirildikten sonra kavru olan malt örneklerinde olduğu tespit edilmiştir.

Fermantasyon süresi boyunca örneklerin pH ve toplam asitlik değerlerindeki değişim Tablo 3'de; Sirke örneklerinin fermantasyon süresince pH ve asitlik değerlerine ait varyans analiz sonuçları ise Tablo 4'de belirtilmiştir.

Fermantasyon süresince örneklerin pH değerlerinin azaldığı, % asitlik değerlerinin ise artış gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre; sirke çeşidi, fermantasyon süre ve sirke çeşidi x fermantasyon süresi etkilerinin çok yüksek derecede anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P<0.0001$). Fermantasyon süresince pH değişimlerinde en yüksek pH değeri 3.42 ile fermantasyonun 7. gününde malttan üretilen sirke örneğinde, en düşük pH değeri ise 3.01 ile 7 gün süre ile çimlendirilen örneklerde olduğu belirlenmiştir. 28 günlük fermantasyon süresince en düşük toplam asitlik değeri %1.96 ile fermantasyonun 7. gününde 7 ve 12 gün süre ile çimlendirilen örneklerde, buna karşın en yüksek toplam asitlik değeri ise %4.98 ile fermantasyonun 28. gününde malttan yapılan sirke örneklerinde olduğu tespit edilmiştir.

Sirke örneklerinin kuru madde, asitlik, briks, kül, iletkenlik ve yoğunluk değerlerinin malt örneğine kıyasla çimlenmiş örneklerde daha yüksek olduğu ($P<0.05$); aksine pH, alkol, antioksidan kapasitesi ve

toplam fenolik madde miktarlarının ise daha düşük olduğu belirlenmiştir ($P<0.05$) (Tablo 5). Örnekler arasında en düşük kuru madde ve kül miktarı (%5.25 ve %1.65) malt örneğinde, en yüksek kuru madde miktarı ise (%8.41 ve %2.47) 7 gün çimlendirilip kavrulmuş malt örneğinde olduğu belirlenmiştir.

Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre sirke çeşidinin yapılan analizler açısından çok yüksek derecede anlamlı olduğu ($P<0.0001$), sirke çeşidi x fermantasyon zamanı interaksyonunun ise kurumadde ve pH değerleri üzerinde etkili olduğu ($P<0.05$) tespit edilmiştir (Tablo 6).

Morales ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada sirkelerdeki kuru madde miktarlarının 10.3 g/l ile 12.9 g/l arasında belirtmişlerdir. Aykın (2013), elma sirkesi ve elma sirke anası örneklerin toplam kuru madde miktarlarını ortalama %2.14 ve %2.42 olarak bulduğunu bildirmiştir. Araştırmalar arasındaki mevcut farklılıkların üretimde kullanılan hammadde farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

3 farklı sirke örneğine ait en yüksek pH ve en düşük toplam asitlik değerleri sırasıyla 3.27 ve %4.04 ile malt sirkesine, en düşük pH ve en yüksek toplam asitlik değerlerinin ise; 3.01 ve %4.66 ile 7 gün süre ile çimlendirildikten sonra kurutulan malt örneğine ait olduğu tespit edilmiştir (Tablo 5). Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre sirke çeşidi ve fermantasyon zamanı interaksyonlarının çok yüksek derecede anlamlı olduğu ($P<0.0001$) buna karşın sirke çeşidi x fermantasyon zamanı interaksyonunun ise (toplam asitlik hariç) anlamlı olduğu ($P<0.05$) tespit edilmiştir (Tablo 6).

Araştırma sonuçlarımıza paralel şekilde, Ünal (2007), Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimim üzerine yapmış olduğu bir çalışmada Dimrit üzüm sirkesinin pH ve toplam asitlik değerlerini 2.68-2.85 ve 4.14-%6.59 g/100 mL aralığında bulunduğunu ifade etmiştir. Budak ve ark. (2011), tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, farklı yöntemlerle üretilen elma sirkesi örneklerinin pH ve toplam asitlik miktarının sırasıyla 2.83-3.21 ve %55.16 g/L - 73.86 g/L arasında olduğu belirtilmiştir.

Örnekler briks (%) ve alkol (%) miktarları bakımından incelendiğinde, en düşük brix değerlerin malt sirkesinde (%4.8), en düşük alkol miktarının ise 7 gün çimlendirildikten sonra kurutulan örneklerde (%0.032) olduğu belirlenmiştir. Buna karşın en yüksek değerlerin ise; sırasıyla 12 ve 7 gün çimlendirildikten sonra kurutulan malt (%5.7 ve %0.025) örneklerine ait oldukları tespit edilmiştir. Yapılan varyans analiz sonuçlarına göre her iki analiz sonucunda da en yüksek değerlerin sırasıyla 4.21 mS/cm ve 1.0351 g/cm³ ile 12 gün süreyle çimlendirildikten sonra kurutulan malt örneklerinden yapılan sirkelere ait olduğu tespit edilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına

göre her iki analiz içinde sirke çeşidinin çok yüksek derecede anlamlı olduğu ($P<0.0001$), buna karşın sadece yoğunluk analizi için fermantasyon zamanı sirke çeşidi x fermantasyon zamanı interaksyonlarının anlamlı olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir.

Kadaş (2013), alıç sirkesinde briks miktarını %5.33, Marangoz (2016) karadut suyu sirkesinde yapımında, alkol fermantasyonu sonrası ve asidifikasyon sonrası briks değerleri sırasıyla %2.65 ve %1.8 olarak belirlemişlerdir. Briks (%) değerleri arasındaki farklılıkların sirkelerin üretiminde kullanılan hammaddeler ile üretim şekillerindeki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Alkol miktarları açısından ise araştırma sonucu elde ettiğimiz değerler Kobya (2018) ve Yeşilirmak (2019) elde ettiği veriler ile paraleldir.

Sirke örneklerine ait iletkenlik (mS/cm) ve yoğunluk (g/cm³) değerlerinin çimlendirme süresi boyunca artış gösterdiği belirlenmiştir ($P<0.05$). Her iki analiz sonucunda da en yüksek değerlerin sırasıyla 4.21 mS/cm ve 1.0351 g/cm³ ile 12 gün süreyle çimlendirildikten sonra kurutulan malt örneklerine ait olduğu tespit edilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre her iki analiz içinde sirke çeşidi interaksyonunun çok yüksek derecede anlamlı olduğu ($P<0.0001$), buna karşın sadece yoğunluk analizi için fermantasyon zamanı sirke çeşidi x fermantasyon zamanı interaksyonlarının anlamlı olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir. Elde ettiğimiz değerler Budak (2010), Kadaş (2013) ve Yeşilirmak (2019) çalışmaları ile paralellik göstermektedir.

Üç farklı örnek ile üretilen malt sirkesi örneklerinin antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik madde miktarlarının çimlendirme süresi artışına bağlı olarak azalış gösterdiği tespit edilmiştir ($P<0.05$). En yüksek değerlerinin 1.15 µg TE/mL ve 690.30 mg GAE/L ile malt sirkesi örneklerine, en düşük değerlerin ise 0.88 µg TE/mL ve 373.81 mg GAE/L ile 12 gün süre ile çimlendirildikten sonra kurutularak sirkesi yapılan malt örneklerinde olduğu belirlenmiştir. Her iki analiz içinde sirke çeşidi ve fermantasyon zamanı faktörlerinin interaksyonlarının çok yüksek derecede anlamlı ($P<0.001$) olduğu yapılan varyans analizleri ile ortaya konulmuştur.

Er (2011) farklı ön işlem ve kurutma sıcaklığı uygulanmış kırmızı pancarın antioksidan kapasitesine (DPPH) ait verilerin metanol ekstraktında 1771 µmol Trolox eşdeğeri/100 g ve 5133 µmol Trolox eşdeğeri/100 g arasında değiştiğini, toplam fenolik madde içeriklerinin ise 671.1 mg GAE /100 g ile 1399.8 mg GAE/100 g arasında değiştiğini bildirmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların uygulanan proses ve hammadden kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Üç farklı malt sirkesi örneğinin fermantasyon bitimindeki renk değer değerleri Tablo 7'de gösterilmiştir. Örneklere ait L* ve b* değerlerinin çimlendirme süresi boyunca azalış gösterdiği (P<0.05) buna karşın a* değerinin ise artış gösterdiği (P<0.05) belirlenmiştir. Örnekler arasında en yüksek L* ve b* değerlerine sahip numune 58.81 ve 37.40 ile malt örneği iken en yüksek a* değerine sahip örneğin 12 gün süre ile çimlendirildikten sonra kurutulan malttan üretilen sirke örneği olduğu tespit edilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına göre ise L*, a* ve b* değerlerinin sirke çeşidi ve fermantasyon zamanı interaksiyonlarının çok yüksek derecede anlamlı olduğu (P<0.0001) belirlenmiştir.

Malt sirkesi örneklerine ait mineral madde analiz sonuçları Tablo 8'de verilmiştir. Sirke örneklerinde en yüksek Na, Mg, B ve S miktarları malt sirke örneklerinde, K, P, Ca, Mn miktarları ise 12 günlük çimlendirilip kavrulmuş sirke örneklerinde ve Fe, Zn

miktarları ise 7 günlük çimlendirilip kavrulmuş sirke örneklerinde olduğu belirlenmiştir. Na, Mg, B ve S minerallerinin çimlendirme süresi ile azaldığı (P<0.05), K, P, Fe, Ca, Mn ve Zn minerallerinin ise çimlendirme süresi ile artış (P<0.05) gösterdiği tespit edilmiştir. Yeşilirmak (2019) çalışmasında elde ettiği mineral madde değerleri ile araştırmamız bulguları arasında farklılıklar mevcuttur. Değerler arasındaki değişkenliğin üretimde kullanılan hammadde ve proses farklılıklarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

28 günlük fermantasyon süresi sonucunda üç farklı sirke örneğinin duyu analizi değerlendirilmesi sonucunda en yüksek renk, aroma, koku, görünüş ve genel beğeni kriterleri açısından 7 günlük çimlendirilip kavrulmuş malttan üretilen sirke örneklerinin aldığı ve çimlendirme süresinin uzamasının renk skorlarını düşürdüğü tespit edilmiştir (P<0.05) (Tablo 9).

Tablo 1. Sirke üretiminde kullanılan malt ile 7 ve 12 gün süre boyunca çimlendirilen malt örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları

Table 1. Results of chemical analysis of malt used in vinegar production and germinated malt samples for 7 and 12 days

Örnek	Kuru Madde Değeri (%)	pH	Titrasyon Asitliği (%)	Briks Değeri (%)	Kül Miktarı (%)	Antioksidan Kapasitesi (µg TE/mL)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/L)
Malt	8.79 ^c	5.22 ^a	2.84 ^a	10.6 ^b	2.08 ^c	2.48 ^b	654.85 ^a
CM7	9.61 ^b	4.83 ^c	2.30 ^b	11.2 ^a	2.50 ^b	2.51 ^a	580.66 ^b
CM12	10.5 ^a	5.04 ^b	2.21 ^b	11.6 ^a	2.86 ^a	1.75 ^c	340.49 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 2. Sirke üretiminde kullanılan malt ile 7 ve 12 gün süre boyunca çimlendirilen malt örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları (ppm)

Table 2. Results of chemical analysis of malt used in vinegar production and germinated malt samples for 7 and 12 days (ppm)

Örnek	Na	Mg	K	P	Fe	Ca	B	Mn	Zn	S
Malt	786.60 ^c	1118.10 ^a	1720.01 ^a	1896.45 ^b	8.07 ^c	655.48 ^c	5.59 ^a	4.05 ^c	18.12 ^c	311.51 ^a
CM7	872.30 ^a	1035.84 ^b	1562.65 ^b	1948.23 ^a	13.5 ^a	1014.22 ^b	5.30 ^b	4.96 ^b	22.45 ^a	165.20 ^b
CM12	805.44 ^b	985.72 ^c	1734.82 ^a	1536.74 ^c	12.85 ^b	1046.50 ^a	5.07 ^c	5.12 ^a	20.53 ^b	150.71 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 3. Sirke örneklerinin fermantasyon aşamasındaki pH ve % toplam asitlik değerleri

Table 3. pH and % total acidity values during fermentation phase of vinegar samples

Analiz	Örnek	Fermantasyon Zamanı (Gün)			
		7	14	21	28
pH	Malt	3.42 ^{Da}	3.38 ^{Ca}	3.33 ^{Bb}	3.30 ^{Aa}
	CM7	3.15 ^{Dc}	3.10 ^{Cc}	3.05 ^{Bc}	3.01 ^{Ad}
	CM12	3.26 ^{Db}	3.17 ^{Bc}	3.18 ^{Bd}	3.15 ^{Ae}
Toplam Asitlik (%)	Malt	2.96 ^{Ca}	4.05 ^{Aa}	4.43 ^{Aa}	4.98 ^{Bb}
	CM7	1.96 ^{Cb}	3.44 ^{Bd}	4.34 ^{ABc}	4.88 ^{Abc}
	CM12	1.96 ^{Cb}	3.78 ^{Ac}	4.20 ^{Ab}	4.70 ^{Bed}

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

A-D (→) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 4. Sirke örneklerinin fermentasyon süresince pH ve asitlik değerlerine ait varyans analiz sonuçları (P Değeri)

Table 4. Variance analysis results for pH and acidity values during fermentation of vinegar samples (P Value)

Faktör	pH	Asitlik
Sirke Çeşidi (S)	<0.0001	<0.0001
Fermantasyon Zamanı (Z)	<0.0001	<0.0001
Sirke Çeşidi x Fermantasyon Zamanı (S x Z)	<0.0001	<0.0001

P<0.0001: Çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı.

Tablo 5. Sirke örneklerine ait kimyasal analiz sonuçları

Table 5. Chemical analysis results of vinegar samples

Örnek	KM (%)	pH	Asitlik (%)	Briks (%)	Alkol (%)	Kül (%)	İletkenlik (mS/cm)	Yoğunluk (g/cm ³)	Antioksidan Kapasitesi (µg TE/mL)	Toplam Fenolik (mg GAE/L)
Malt	5.25 ^c	3.27 ^a	4.04 ^c	4.8 ^c	0.032 ^a	1.65 ^c	3.45 ^c	1.0278 ^c	1.15 ^a	690.30 ^a
CM7	8.41 ^a	3.01 ^c	4.66 ^a	5.3 ^b	0.025 ^c	2.47 ^a	3.88 ^b	1.0347 ^b	1.12 ^b	521.59 ^b
CM12	7.12 ^b	3.14 ^b	4.51 ^b	5.7 ^a	0.028 ^b	2.03 ^b	4.21 ^a	1.0351 ^a	0.88 ^c	373.81 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 6. Sirke örneklerine ait kimyasal analiz varyans analiz sonuçları

Table 6. Chemical analysis variance analysis results of vinegar samples

Faktör	KM (%)	pH	Asitlik (%)	Briks (%)	Alkol (%)	Kül (%)	İletkenlik (mS/cm)	Yoğunluk (g/cm ³)	Antioksidan Kapasitesi (µg TE/mL)	Toplam Fenolik (mg GAE/L)
Sirke Çeşidi(S)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Fermantasyon Zamanı (Z)	0.199	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.339	0.750	0.258	<0.0001	<0.0001
S X Z	0.043	0.049	0.935	0.954	0.478	0.978	0.990	0.498	0.300	0.640

0.01<P<0.05: İstatistiksel olarak anlamlı, 0.0001<P<0.01: Yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı,

P<0.0001: Çok yüksek düzeyde istatistiksel olarak anlamlı, P>0.05: İstatistiksel olarak anlamlı değil.

Tablo 7. Sirke örneklerine ait renk analiz sonuçları

Table 7. Color analysis results of vinegar samples

Örnek	Renk Değeri		
	L*	a*	b*
Malt	58.81 ^a	3.42 ^c	37.40 ^a
CM7	41.50 ^b	10.50 ^b	19.32 ^b
CM12	29.71 ^c	13.64 ^a	14.63 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 8. Sirke örneklerine ait mineral madde analiz sonuçları (ppm)

Table 8. Mineral matter analysis results of vinegar samples (ppm)

Örnek	Na	Mg	K	P	Fe	Ca	B	Mn	Zn	S
Malt	683.65 ^a	371.80 ^a	1051.05 ^c	785.55 ^c	3.82 ^c	156.80 ^c	5.32 ^a	2.51 ^b	8.03 ^c	292.30 ^a
CM7	667.10 ^b	340.55 ^b	1163.05 ^a	873.90 ^b	9.05 ^a	289.70 ^b	4.82 ^b	2.96 ^{ab}	11.47 ^a	152.45 ^b
CM12	647.90 ^b	320.70 ^c	1139.91 ^b	900.55 ^a	7.72 ^b	307.70 ^a	4.41 ^c	4.13 ^a	10.74 ^b	130.35 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan değerler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

Tablo 9. Sirke örneklerine ait duyu analizi sonuçları

Table 9. Sensory analysis results of vinegar samples

Örnek	Renk	Aroma	Koku	Görünüş	Genel Beğeni
Malt	7.51 ^a	7.00 ^b	7.53 ^b	8.52 ^b	7.02 ^b
CM7	7.50 ^a	9.02 ^a	9.00 ^a	9.04 ^a	8.50 ^a
CM12	6.00 ^b	6.03 ^c	7.02 ^b	6.06 ^c	5.54 ^c

a-c (↓) Aynı harfleri taşıyan ortalamalar arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir (P>0.05).

CM7: Çimlendirilmiş 7 günlük malt, CM12: Çimlendirilmiş 12 günlük malt.

SONUÇ

Sirke, sağlık üzerine olumlu etkileriyle her geçen gün kullanımı ve gıda sanayisinde üretimi artan bir fermente üründür. Genellikle, gıda sektöründe hammadde olarak elma ve üzüm tercih edilse bile, içerisinde şeker içeren tüm meyve, sebze ve hatta tahıllar gibi her türlü hammaddeden sirke üretilebilmektedir.

Dünya’da ve Türkiye’de arpa ekimi buğdaydan sonra ikinci sırada yer almasına rağmen arpa genel olarak bira üretiminde ve unlu mamuller üretiminde kullanım alanı bulmaktadır. Maltı sirke olarak yaygın olarak üreten ülkeler; İngiltere ve Kanada’dır.

Yapılan araştırmalar, arpanın malt ve çim halinin besin değerleri yüksek, ekimi verimli, mineral madde içeriği zengin ve antioksidan kapasite değerleri insan sağlığı ve beslenmesinde önemli bir gıda maddesi olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak, malt sirkesinin ülkemizde yöresel üretimden çıkıp sektörel pazarda yer alması gerektiği ve malt sirkesi veya meyve sirkelerinin sadece salata ve soslarda çeşni olarak değil, uzak doğu ülkelerinde olduğu gibi çeşitli meyve sularıyla seyreltilerek ülkemizin içecek sektörüne alternatif fonksiyonel bir ürün olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alak GD.** Bal ve bal sirkesinin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli, 2015.
- Altuğ T, Elmacı Y.** Gıdalarda Duyusal Değerlendirme. Meta Basım Matbaacılık, Ankara. 2005.
- Anonim.** TS 4369 Arpadan Yapılan ve Bira üretiminde Kullanılan Malt Standartları. TSE, Ankara. 2015.
- Anonymous.** SPSS Version 23.0.0.0 for Windows SPSS Inc. Shicago IL, USA. 2015.
- AOAC.** Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 17th edition. AOAC, Washington DC, USA. 2000.
- Aykın E.** Farklı sirkelerden üretilen sirke analarının biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi. Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2013.
- Bamforth CW, Barclay AHP.** Malting Technology and the Uses of Malt, In: Chemistry and Technology, Ed; MacGregor AW, Bhatti RS, American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, Minnesota, USA. 1993; pp. 297-354.
- Bonoli M, Verardo V, Marconi E, Caboni MF.** Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometer study among extraction methods of

freeand bound phenolic compounds. J Agric Food Chem. 2004; 52: 5195-5200.

- Budak NH, Kumbul Doguc D, Savas CM, Seydim AC, Kok Tas T, Ciris MI, Guzel-Seydim ZB.** Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011; 59(12): 6638-6644.
- Celus I, Brijsjan K, Delcour A.** The effects of malting and mashing on barley protein extractability. Journal of Cereal Science. 2006; 44(2): 203-211.
- Cemeroğlu B.** Gıda Analizleri, Gıda Teknolojisi Yayınları No:34, Ankara. 2007.
- Chu SC, Chen C.** Effects of origins and fermentation time on the antioxidant activities of kombucha. Food Chemistry. 2006; 98(3): 502-507.
- Enari TM, Sapanen T.** Mobilisation of endosperm reserves during the germination of barley. Journal of the Institute of Brewing. 1986; 92: 25-31.
- Er T.** Kırmızı pancarın bazı fiziksel ve fitokimyasal özellikleri üzerine farklı kurutma sıcaklıklarının etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2011.
- Faivre J, Bonithon-Kopp C.** Diets, fibers and colon cancer. Adv Exp Med Biol. 1999; 72: 199-206.
- Frost G, Leeds AA, Dore CJ, Maderios S, Brading S, Dornhurst A.** Glycaemic index asa determinant of serum, cholesterol concentration. Lancet. 1999; 353: 1045-1048.
- Fu L, Xie HL, Ferro MD.** Rapid multi-element analysis of Chinese vinegar by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. European Food Research and Technology. 2013; 237: 795-800.
- Gallaher DD, Hassel CA, Lee KJ, Gallaher CM.** Viscosity and fermentability as attributes of dietary fiber responsible for hypocholesterolemic effects in hamsters. J Nut. 1993; 123: 244-252.
- Giudici P, Gullo M, Solieri L.** Traditional Balsamic Vinegar, In: Vinegars of the World, Ed; Solieri L, Giudici P, Springer-Verlag, Milan, Italy. 2009; pp. 157-177.
- Goupy P, Hugues M, Boivin P, Amiot MJ.** Antioxidant composition and activity ofbarley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. J Agric Food Chem. 1999; 79: 1625-1634.
- Han L, Yun J, Han X.** Determination of amino acids, major minerals and vitamin in barley malt (*Hordeum ‘Ganpi No.3’*) Journal of Gansu Agricultural University. 2009; 44(3): 151-152
- Johnston CS, Gaas CA.** Vinegar: medicinal uses and antiglycemic effect. Clin Nutr Obes. 2006; 8: 61-69.
- Kadaş Z.** Alç Sirkesinin biyoaktif özelliklerinin ve metabolik etkilerinin incelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bolu, 2013.
- Kırca A, Özkan M, Cemeroğlu B.** Effects of temperature, solid content and pH on the stability of black carrot anthocyanins. Food Chemistry. 2007; 101: 212-218.
- Koby NH.** Polen, propolis ve nohut ilavesiyle üretilen organik kestane balı sirkelerinin fiziksel, kimyasal ve biyoaktif bileşenlerinin tespiti. Yüksek Lisans Tezi, Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gümüşhane, 2018.

- MacGregor AW, Bhatti RS.** Barley: Chemistry and Technology, American Association of Cereal Chemists, Inc., Minnesota, USA. 1993; pp. 297.
- Madhujith T, Shahidi F.** Antioxidative and antiproliferative properties of selected barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars and their potential for inhibition of Low-Density Lipoprotein (LDL) cholesterol oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2007; 55(13): 5018-5024.
- Marangoz İF.** Sirke üretim prosesinin karadut meyvesinin biyoaktif bileşenleri ve antioksidan özelliklerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Çanakkale On Sekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Çanakkale, 2016.
- Morales ML, Tesfaye W, García-Parrilla MC, Casas JA, Troncoso AM.** Sherry wine vinegar: physicochemical changes during the acetification process. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2001; 81(7): 611-619.
- Murooka Y, Nanda K, Yamashita M.** Rice Vinegars, In: Vinegars of the World, Ed; Solieri L, Giudici P, Springer-Verlag, Milan, Italy. 2009; pp. 121-133.
- Pinsirodom P, Rungeharoen J, Liumminful A.** Quality of commercial wine vinegars evaluated on the basis of total polyphenol content and antioxidant properties. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 2008;1(4):232-241
- Plessi M.** Vinegar, In: Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2 nd Edition), Ed; Caballero B, Elsevier Science Ltd, Maryland, ABD. 2003; pp. 5996-6003.
- Quinde Z, Ullrich SE, Baik BK.** Genotypic variation in color and discoloration potential of barley-based food products. Cereal Chem. 2004; 81: 752-758.
- Rainieri S, Zambonelli C.** Organisms Associated with Acetic Acid Bacteria in Vinegar Production, In: Vinegars of the World, Ed; Solieri L, Giudici P, Springer-Verlag, Milan, Italy. 2009; pp. 73-95.
- Rommel A, Heatherbell DA, Wrolstad RE.** Red raspberry juice and wine: effect of processing and storage on anthocyanin pigment composition, color and appearance. Journal of Food Science. 1990; 55: 1011-1017.
- Treck J, Teuber M.** Genetic and Restriction Analysis of the 16S-23S rDNA Internal Transcribed Spacer Regions of the Acetic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters, 2002; 208: 69-75.
- Ünal E.** Dimrit üzümünden değişik yöntemlerle sirke üretimi üzerinde bir araştırma. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- Yeşilirmak D.** Pirinçten elde edilen sirke benzeri ürünlerin bazı özelliklerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2019.

Determination of The Effects of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid on Hematological Parameters in Rats Given Alcohol

Mehmet BAŞEĞMEZ¹, Muhammed ETYEMEZ², İbrahim DURMUŞ³, Abdullah ERYAVUZ^{4*}

¹Pamukkale University, Acıpayam Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 20100, Denizli, Turkey

²Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, 31000, Hatay, Turkey

³Afyon Kocatepe University, Şubut Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 03100, Afyonkarahisar, Turkey

⁴Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

In modern agriculture, many compounds such as pesticides, herbicides and various kinds of fertilizers are frequently used in the fields to increase crop production. However, among these compounds, widespread usage of synthetic herbicides for agricultural purpose has an adverse effect on living organisms and can lead to several hematological and neurological complications in human and animals. Alcohol consumption is one of the potential risk factors in cardiovascular disease. The aim of this study is to investigate the effects of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), used commonly by farmers as a herbicide, on hematological changes in rats given alcohol. Totally 28 Sprague Dawley male rats were randomly divided into four groups containing 7 animals per group. While first group served as a control, experimental groups were as follows; herbicide group (5 mg/kg, 2,4- D, orally), alcohol group (3 mg/kg ethyl alcohol, orally), herbicide plus alcohol group (5 mg/kg 2,4-D and 3 mg/kg ethyl alcohol, orally). In the end of experimental period lasted totally 60 days, the blood samples were taken from animals by cardiac puncture under anesthesia. In the blood samples, erythrocyte (RBC), total leukocytes (WBC) and percentage of the different white blood cells, hematocrit value (HCT), hemoglobin concentration (HGB) and platelet counts (PLT) were determined. 2,4-D increased the WBC, percentage of lymphocyte, monocyte and granulocyte numbers. Alcohol and alcohol plus 2,4-D application reduced RBC numbers, HGB, HCT value and PLT concentration. The mean corpuscular hemoglobin level (MCH) was increased by alcohol, 2,4 D and alcohol plus 2,4 D treatments. We concluded that 2,4-D application in rats given alcohol leads to changes in hematological parameters.

Keywords: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, alcohol, hematological parameters, rat.

Alkol Verilen Sıçanlarda 2,4-Diklorofenoksi Asetik Asitin Hematolojik Parametreler Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi

ÖZ

Modern tarımda, pestisit, herbisit ve çeşitli gübreler gibi birçok bileşik, bitki üretimini arttırmak için sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu bileşikler arasında, sentetik herbisitlerin tarımsal amaçlı yaygın kullanımı, canlı organizmalar üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olup, insan ve hayvanlarda çeşitli hematolojik ve nörolojik komplikasyonlara yol açabilmektedir. Alkol tüketimi, kardiyovasküler hastalıkta potansiyel risk faktörlerinden biridir. Bu çalışmanın amacı, yaygın olarak çiftçiler tarafından herbisit olarak kullanılan 2,4-diklorofenoksi asetik asidin (2,4-D), etil alkol verilen sıçanlarda hematolojik değişikliklere etkisini araştırmaktır. Toplam 28 Sprague Dawley erkek sıçan rastgele olarak grup başına 7 hayvan içerecek şekilde dört gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol olarak görev yaparken, deney grupları şöyledir; herbisit grubu (5 mg / kg, 2,4 D, oral yoldan), alkol grubu (3 mg / kg etil alkol, oral yoldan), herbisit + alkol grubu (5 mg / kg 2,4D ve 3 mg / kg etil alkol, oral yoldan). Altmış günlük toplam deney süresi sonunda kan örnekleri anestezi altında kalp punksiyonu ile hayvanlardan alındı. Kan örneklerinden eritrosit (RBC), toplam lökosit sayısı (WBC) ve yüzde oranları ile trombosit sayısı (PLT), hematokrit değeri (HCT) ve hemoglobin (HGB) düzeyi belirlendi. 2,4-D uygulanan hayvanlarda, WBC, lenfosit, monosit ve granülosit yüzdelik değerlerinin arttığı bulundu. Alkol ve alkol ile birlikte 2,4-D uygulanan hayvanlarda, RBC, HGB, HCT ve PLT sayılarının azaldığı tespit edildi. Alkol, 2,4-D ve alkol ile birlikte 2,4 -D uygulamalarının, her bir kırmızı kan hücreesindeki ortalama hemoglobinin seviyesini (MCH) arttırdığı gözlemlendi. Sonuç olarak, alkol verilen sıçanlarda 2,4-D uygulamasının hematolojik parametrelerde değişikliklere neden olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: 2,4-diklorofenoksi asetik asit, alkol, hematolojik parametreler, rat

To cite this article: Başeğmez M, Etyemez M, Durmuş İ, Eryavuz A. Determination of The Effects of 2,4-Dichlorophenoxy Acetic Acid on Hematological Parameters in Rats Given Alcohol. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):38-44.

Submission: 12.11.2019 Accepted: 01.02.2020 Published Online: 10.02.2020

ORCID ID; MB: 0000-0002-9994-1251, ME: 0000-0003-0497-1878, İD: 0000-0003-1360-8843, AE: 0000-0001-8602-2400

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

GİRİŞ

Dünyada yaşayan insan nüfusundaki hızlı artışın yol açtığı gıda talebinin karşılanması için hem tarımsal hem de hayvansal üretimin artırılması, geliştirilmesi ve iyileştirilmesi gerekmektedir. Günümüz modern tarımsal faaliyetlerinde, üretimin artırılması ve iyileştirilmesi için pestisitler, herbisitler ve çeşitli gübreler gibi birçok kimyasal bileşik yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu kimyasal bileşiklerin kullanılmasının yaygınlaşması, uygulandığı üretim alanlarında bu kimyasallara maruz kalmış insan ve hayvanların sağlığında olumsuz etkilere yol açabileceği yönünde endişelere de yol açmıştır (Tiryaki ve ark. 2010). Nitekim, bitkilerin azot ihtiyacını karşılamak amacıyla toprağa katılan ve dünyada yaygın kullanılan nitrattlı gübrelerin, yer altı sularına karışarak insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiği ortaya konmuştur (Vural, 2005). Bu kimyasal bileşiklerden biri olan ve tüm dünya genelinde yabancı otların yok edilmesi amacıyla zirai mücadelede yaygın olarak kullanılan herbisitler de insan ve hayvan sağlığını tehdit ettiği ileri sürülen kimyasal bileşiklerdendir (Teixeira ve ark. 2007). Herbisitlerin ve parçalanma ürünlerinin hücrelerde yol açtığı zararların incelenmesi ve ortaya çıkartılması önem arz etmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan insanlarda yapılan bir araştırmada, serumda 3 ila 65 µg/L düzeyinde pestisit kalıntısı bulunduğu tespit edilmiştir (Hill ve ark. 1995). Tüm pestisitlerde olduğu gibi herbisitler de uygulama sonrası kimyasal ve biyolojik olarak parçalanmasına rağmen bile beklenenden daha uzun süre toprak ve bitkilerde kalıcı olabilmektedir (Tiryaki ve ark., 2010). İnsan ve hayvanlar gerek ilaçlama esnasında gerekse kalıntı içeren bitkilerin tüketilmesi ve içme sularının kullanılmasıyla bu maddelere maruz kalabilmekte ve organizmada nörolojik ve hematolojik yan etkilere sebep olabilmektedir. Nitekim, herbisite maruz kalan balıkların kan parametrelerinde önemli derecede değişiklikler gözlemlendiği bildirilmektedir (Gholami-Seyedkolaei ve ark. 2013).

Tarımsal faaliyetlerde yabancı otları kontrol etmek için genel uygulanabilirliği ve düşük maliyeti nedeniyle dünyada en yaygın kullanılan herbisitlerden biri de 2,4-diklorofenoksiasetik asittir (2,4-D) (Song, 2014). Bu maddeye maruz kalan insanlarda bir dizi biyolojik etkilere sahip olduğunun ortaya konmasından dolayı (Lerda ve Rizzi, 1991), 2,4-D'nin neden olduğu yan etkilerinin mekanizmaları in vitro ve in vivo hala araştırılmaktadır. Nitekim, 2,4-D'nin sinir sistemi (Bortolozzi ve ark., 2004), üriner sistem (Uyanıkgil ve ark., 2009) ve eritrositlere (Tayeb ve ark., 2010) olan etkilerine yönelik çalışmalar yapılmıştır. 2,4-D'nin amin ve ester formlarında karsinojenik bir madde olan dioksinin bulunması bu maddeyi çok daha tehlikeli bir hale getirmektedir. Nitekim, 2,4-D'ye uzun süreli maruz kalan köpek ve farelerde karaciğer ile böbrek lezyonlarına rastlandığı (Hayes ve ark., 1991), 2,4-D

kullanılan golf sahalarında oyundan önce golf toplarını yalayan oyunculara karaciğer iltihabı (hepatitis) olgularının gözlemlendiği bildirilmektedir (Leonard ve ark. 1997). Bununla birlikte, organizmada ana taşıyıcı olarak görev yapan kanda 2,4-D'nin yol açtığı hematolojik değişikliklere yönelik çalışma sayısı oldukça yetersizdir.

Canlılarda hematolojik ve biyokimyasal parametrelerdeki değişimler; pek çok klinik ve subklinik hastalıkların ayırıcı tanısı, şiddetinin belirlenmesi, seyrinin takibi ve tedavinin ulaştığı düzeyin tespiti ile vücuttaki metabolik olayları ve organların fonksiyonlarını yansıması bakımından hekimlere ve araştırmacılara önemli bilgiler vermektedir. Ayrıca, toksikolojik araştırmalar ve çevresel faktörlerin yol açtığı fizyolojik ve patolojik değişikliklerin olası bir biyolojik işareti olarak izlenen hematolojik değerlerde meydana gelen değişimler, sağlıklı yaşamın kontrol programları içerisinde ve çevre ile beslemenin kan yapan organlara etkisinde de başvurulan parametreler arasında yer almaktadır (Gholami-Seyedkolaei ve ark. 2013). Bu nedenle, uygulandığı bölgelerde yaşayan insan ve hayvanların maruz kalmaları halinde, 2,4-D'nin organizmada ana taşıyıcısı olarak görev yapan kanda yol açtığı hematolojik değişikliklerin ortaya konmasını gerektirmektedir.

Tüm dünyada insanlar tarafından zararlı olduğu bilinmesine rağmen bile alkol tüketimi yapılmaktadır. Alkol tüketiminin hematolojik değerleri etkilediği bilinmektedir (Tyulina ve ark. 2000; 2002). Bununla birlikte, alkol tüketen bireylerin yabancı otlarla mücadelede yaygın olarak kullanılan herbisite maruz kalmalarına bağlı hematolojik parametrelerde meydana gelen değişikliklere yönelik bir veri bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma, alkol verilen sıçanların 2,4-D alımına maruz kalmalarına bağlı hematolojik parametrelerdeki değişimlerin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada hayvan materyalini AKÜ Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen 10-12 haftalık yaşta, 28 adet Sprague Dawley türü erkek (yaklaşık 300-400 g) oluşturdu. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından onay (etik numarası: 49533702/09) doğrultusunda gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirildi. Sıçanların beslenmesinde standart rat yemi ve içme suyu her gün taze olarak verildi. Çalışmada kullanılacak olan 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) (Amel ve ark., 2016) ve etil alkol (Kamoun ve ark. 2017) verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak belirlendi.

2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ticari müstahzarı şeklinde (ESTER'H, Hektaş Tic. A.Ş., Kocaeli, Türkiye), alkol ise kimyasal madde olarak (Sigma-Aldrich, MO, USA) temin edildi.

Hayvanlar rastgele örnekleme metodu ile her grupta 7 sıçan olacak şekilde 4 gruba ayrıldı ve çalışmada gruplara uygulanan yöntem Tablo 1 de verildi.

Tablo 1. Gruplar, gruptaki hayvan sayıları ve uygulama yöntemi.

Table 1. Groups, numbers of animals in groups and the application method.

Gruplar	Gruptaki Hayvan Sayısı	Uygulama Yöntemi
Grup I	7	Kontrol
Grup II	7	Alkol grubuna; 3 g/kg dozunda Etil Alkol gastrik gavaj ile verildi.
Grup III	7	2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) grubuna; 5mg/kg 2,4- (2,4-D) (0,5 ml distile su içinde çözdürülüp) gastrik gavaj ile verildi.
Grup IV	7	2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) + alkol grubuna; 2,4- (2,4-D) 5 mg/kg dozunda ve 3 g/kg dozunda etil alkol gastrik gavaj ile verildi.

Son uygulamaları takiben 24 saat sonrasında hayvanlardan ksilazin ve ketamin anestezisi altında intrakardiyak olarak analizler için kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin; Afyon Kocatepe Üniversitesi, Veteriner Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan kan sayım cihazında (Mindray BC2800 VET, Çin) ölçümleri yapılarak; lökosit (WBC), eritrosit (RBC) ve trombosit (PLT) sayıları, hemoglobini (HGB) miktarı, hematokrit (HCT) değeri ile ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ve ortalama eritrosit hemoglobini düzeyi (MCHC) değerleri belirlendi. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 20.0 istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulandı, veriler "ortalama ± standart sapma" olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada tüm gruplarda elde edilen WBC, % lenfosit, % monosit, % granulosit, RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, % RDW, PLT, MPV, PDW, %

PCT'ye yönelik veriler Tablo 2'de verilmiştir. Çalışmada, 2,4-D uygulaması WBC'yi önemli ($P < 0.05$) oranda artırdı. Alkol ve 2,4-D'nin birlikte uygulamasının; RBC ($P < 0.001$), HGB, HCT ($P < 0.05$) ve PLT ($P < 0.01$) sayılarında Kontrol grubu hayvanlarınkine göre önemli düzeyde düşüşe neden olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, alkol ve 2,4-D'nin birlikte uygulamasının yalnız alkol verilenlere göre, RBC sayısını önemli ($P < 0.05$) ve HGB ile HCT düzeylerini ise önemsiz ($P > 0.05$) düzeyde düşürdüğü bulundu (Tablo 2). Alkol ve 2,4-D'in hem ayrı hem de birlikte kullanımı, Kontrol grubu hayvanlardakine göre MCH seviyesinde önemli düzeyde ($P < 0.05$) artışa sebep oldu. Ayrıca granülosit ve monositlerin sayılarının; alkol verilen gruplarda etkilenmediği, sadece 2,4-D uygulaması yapılan hayvanlarda Kontrol grubu hayvanlardakine göre önemli ($P < 0.05$), lenfosit sayılarında ise önemsiz ($P > 0.05$) düzeyde yüksek olduğu görüldü. Alkol ile birlikte 2,4-D uygulaması yapılan hayvanlarda; lenfosit ve granülosit sayılarının, Kontrol grubu hayvanlardaki değerlerden istatistiksel anlamda önemsiz ($P > 0.05$) düzeyde düşük olduğu görüldü (Tablo 2).

TARTIŞMA

Laboratuvar hayvanlarının yapısı ve işlevi insan ve hayvanların hematopoietik hücre yenilenmesinin prensibi ile karşılaştırılabilir olduğu için, bu hayvanlarda yapılan hematolojik, kan biyokimyasal ve histoloji çalışmalarının sonuçları, bazı durumlarda insan ve hayvanlardaki kimyasal toksisiteyi tahmin etmek için yararlı olabilir. Nitekim, bu hayvanların kullanıldığı çalışmalarda; davranış, genetik, anatomik, fizyolojik ve histolojik yapı ve mekanizmalardaki değişiklikleri, insanlar da dahil olmak üzere tüm memelilere de genelleyerek değerlendirilmeler yapılmaktadır (Taşlıdere ve ark. 2013, Linge ve ark. 2015, Tan ve ark. 2019). Bu nedenle, deney hayvanlarında hematolojik değişikliklerin ortaya konması, çevresel toksik etkilerin organizmadaki değişikliklere katkısını gösterebilir.

Kandaki değişimler toksik stres için ideal bir gösterge olması nedeniyle, herbisitlerin hematolojik değerler üzerindeki etkilerini ve bu değerlere alkol alımının yol açtığı değişiklikleri belirlemek amacıyla yapılan bu çalışmada; hayvanlara daha önce yapılan çalışmalar esas alınarak 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) (Amel ve ark., 2016) ve etil alkol (Kamoun ve ark. 2017) verildi. Alkol alımının biyokimyasal / hematolojik göstergelerini inceleyen daha önceki çalışmalar (Shaper ve ark., 1985, Armutçu ve ark. 2003), belirli meslek gruplarına veya alkolle ilgili sorunlara sahip olanlarla sınırlı kalmıştır. Bu çalışmada alkol alımıyla birlikte herbisite maruz kalmanın hematolojik parametrelerde oluşturduğu etkiler tespit edilmiştir.

Tablo 2. Erkek sıçanlarda 3 g/kg dozunda Etil Alkol, 5mg/kg 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 3 g/kg dozunda Etil Alkol + 5mg/kg 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) uygulamasının hematolojik parametrelerine etkisi (Ortalama \pm standart sapma; $n=7$).

Table 2. The effects of ethyl alcohol at dose 3g/kg, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) at levels of 5 mg/kg and ethyl alcohol (3g/kg) plus 2,4-D (5 mg/kg) on hematological parameters in male rats (Mean \pm standard deviation; $n=7$).

Parametre	KONTROL	ALKOL	2.4D	ALKOL+2.4 D
WBC X10 ⁹ /L	20,91 \pm 3,72 ^b	19,78 \pm 4,83 ^b	47,37 \pm 9,58 ^a	15,03 \pm 2,47 ^b
LENF X10 ⁹ /L	15,21 \pm 3,39 ^{ab}	12,76 \pm 3,06 ^b	25,21 \pm 4,23 ^a	10,68 \pm 2,51 ^b
MON X10 ⁹ /L	0,47 \pm 0,08 ^b	0,43 \pm 0,12 ^b	1,30 \pm 0,29 ^a	0,60 \pm 0,17 ^b
GRAN X10 ⁹ /L	5,22 \pm 1,72 ^b	6,58 \pm 4,05 ^b	20,85 \pm 5,96 ^a	3,75 \pm 0,98 ^b
LENF%	72,67 \pm 7,24	68,46 \pm 12,08	56,80 \pm 6,60	67,51 \pm 10,42
MON%	2,50 \pm 0,49	2,35 \pm 0,44	2,67 \pm 0,31	4,73 \pm 1,57
GRAN%	24,82 \pm 6,86	29,18 \pm 12,01	40,52 \pm 6,46	27,75 \pm 9,34
RBC X10 ¹² /L	8,01 \pm 0,10 ^a	7,31 \pm 0,15 ^b	7,70 \pm 0,10 ^{ab}	6,85 \pm 0,19 ^{c*}
HGB g/dl	16,95 \pm 0,17 ^{ab}	16,26 \pm 0,21 ^{bc}	17,40 \pm 0,29 ^a	15,76 \pm 0,44 ^c
HCT %	35,55 \pm 3,04 ^a	32,83 \pm 2,66 ^{ab}	30,02 \pm 0,70 ^{ab}	27,95 \pm 0,89 ^b
MCV fL	44,08 \pm 3,33	44,81 \pm 3,08	39,00 \pm 0,43	40,88 \pm 0,54
MCH pg	21,11 \pm 0,20 ^b	22,20 \pm 0,35 ^a	22,52 \pm 0,23 ^a	22,96 \pm 0,30 ^{a*}
MCHC g/dL	49,34 \pm 3,33 ^b	50,75 \pm 3,16 ^{ab}	57,95 \pm 0,63 ^a	56,41 \pm 0,54 ^{ab}
RDW %	11,50 \pm 0,16	12,01 \pm 0,23	11,87 \pm 0,16	11,71 \pm 0,32
PLT X 10 ⁹ /L	1131,57 \pm 119,21 ^a	835,50 \pm 67,14 ^b	803,71 \pm 35,56 ^b	734,66 \pm 61,34 ^{b#}
MPV fL	4,25 \pm 0,20	4,32 \pm 0,28	4,18 \pm 0,06	4,31 \pm 0,18
PDW	15,72 \pm 0,16	15,76 \pm 0,15	15,65 \pm 0,07	15,70 \pm 0,10
PCT %	0,42 \pm 0,04	0,36 \pm 0,05	0,33 \pm 0,01	0,32 \pm 0,03

a,b,c,d,e: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir (p<0.05). WBC: Lökosit, LENF: lenfosit, MON: monosit, GRAN: granulosit, RBC: Eritrosit, HGB: hemoglobin, HCT: hematokrit, MCV: ortalama eritrosit hacmi, MCH: her bir kırmızı kan hücresindeki ortalama hemoglobin, MCHC: belli bir miktar kırmızı kan hücresindeki hemoglobin yoğunluğu, RDW: kırmızı kan hücresi dağılım genişliği, PLT: trombosit, MPW: kandaki trombositlerin ortalama boyutu, PDW: trombosit dağılım genişliği, PCT: prokalsitonin, P<0.05, *P<0.001, #P<0.01

Lökosit sayısı klinik pratikte inflamasyonun basit, kolay ve ekonomik bir belirleyicisidir. Enfeksiyon ve enflamasyonun bir belirteci olarak hizmet etmenin yanı sıra, lökosit sayımı, son zamanlarda, bazı hastalıkların yararlı bir belirleyicisi haline gelmiştir (Ishizaka ve ark. 2004). Daha yüksek lökosit sayısı bile normal bir aralıkta, kardiyovasküler hastalık (CVD), tip 2 diyabet ve metabolik sendrom ile ilişkilendirilmektedir (Pei ve ark. 2015). Organizmanın patojenlere karşı korunmasından sorumlu olan lökositler potansiyel olarak organizmaya giren çok sayıda toksik maddeye de maruz kalmaktadır. Kanda bulunan besin maddeleri, ilaçlar ve toksik bileşikler lökositlerin yapı ve fonksiyonunda değişikliklere yol açmaktadır (Yılmaz 2000).

Bu çalışmada; alkol verilen hayvanların lökosit sayısı ve yüzde oranlarında kontrol grubuna göre önemli bir değişiklik olmadığı, 2,4-D verilen hayvanlarda ise değerlerin önemli oranda yüksek olduğu bulundu. Hem alkol hem de 2,4-D verilen hayvanlarda ise lökosit sayılarının kontrol grubundaki hayvanların değerlerine yakın olduğu gözlemlendi. Çalışmada elde edilen bulgular, 2,4-D'ye maruz kalan insanlar (Figgs ve ark. 2000) ile herbisite maruz kalan balıklarda (Gholami-Seyedkolaei ve ark. 2013) kan lökosit düzeylerinin arttığı yönündeki bildirimle uyumluydu.

Figgs ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada, 2,4 D'ye maruz kalan ve alkol tüketen insanlardaki lenfosit proliferasyon indeksinin, alkol kullanmayanlarınkinden önemli düzeyde düşük olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada alkol ve 2,4-D uygulaması yapılan hayvanlardaki lökosit sayısı ve tiplerinin, sadece 2,4-D verilen gruptakilerden önemli düzeyde düşük olması, Figgs ve ark. (2000)'nın gözlemlerini desteklemiştir. Çalışmada, 2,4-D uygulamasına bağlı olarak lökositlerin genel sayısının yanında, tüm tip sayılarında da artış olduğu gözlemlendi. Dokuda metabolize edilmeden ya da birikmeden vücuttan hızla temizlendiği ifade edilen (Saghir ve ark. 2013) 2,4-D'nin biyolojik fonksiyonu ile lökositler arasındaki bağlantı tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte, toksik maddelerin kanda lökosit sayılarının artışına yol açtığı yönündeki bildirim (Yılmaz 2000) dikkate alındığında, bu çalışmada gözlenen lökosit sayısı ve tiplerindeki artışın 2,4-D'nin toksik özelliğine bir cevap olarak gerçekleştiği söylenebilir. 2,4-D'nin lökosit sayısında yol açtığı artışın altında yatan biyolojik mekanizmalar ile bu mekanizmaların hastalıklarla ilişkisi ve alkol kullanımının bu ilişkideki rolünü açıklayacak daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmada; alkol tüketiminin eritrosit sayısını azalttığı ve MCH düzeyini artırdığı bulundu. Anemi teşhisi için

kullanılan göstergelerden hematokrit ve hemogloblin düzeyleri ile eritrosit sayısındaki azalmanın; eritropoez inhibisyonu, hemosentez ve hemopoietik organlarda eritrosit yıkımının artmasından dolayı olabileceği düşünülebilir. Alkol alışkanlığı olanlarda, eritrositlerde hemoliz ve aneminin sık gözlemlendiği bildirilmektedir (Potter 1991). Temel ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada, alkol tüketimi ile eritrosit katalaz aktivitesi arasında güçlü bir ilişkinin olduğunu ve alkol alımının eritrosit katalaz aktivitesini artırdığını bulmuşlardır. Bu bulgu, alkol tüketimine bağlı olarak eritrositlerde oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Nitekim alkol kullanan insanlarda oksidatif stresin yol açtığı lipid peroksidasyon düzeylerinin yükseldiği bildirilmektedir (Armutçu ve ark., 2003). Bu çalışmada alkol verilen sıçanların kontrol grubundakilere göre eritrosit sayısındaki azalma; etanolün eritrositlere doğrudan toksik etkisi (Tyulina ve ark. 2002), serbest radikal üretiminin artması (Armutçu ve ark., 2003) veya eritrosit üretimi için gerekli olan folik asidin alkol kullanımından kaynaklanan noksanlığı (Salaspuro, 1986) nedeniyle olabilir. Çalışmada; alkol verilen sıçanlarda MCH düzeyinin önemli düzeyde artması, MCH'nin alkol alımı ile yüksek düzeyde korele olduğu yönündeki daha önceki bildirimleri (Shaper ve ark. 1985) desteklemektedir.

Herbisitlerin tipi, maruz kalma süresi ve herbisit formülasyonunda uygulanan yüzey aktif madde bileşiklerindeki farklılıklara bağlı olarak hayvanların eritrosit sayısında değişikliklere yol açabileceği ileri sürülmektedir (Gholami-Seyedkolaei ve ark. 2013). Nitekim, balıklarda yapılan çalışmalarda; herbisitlerin eritrosit sayısını, hematorit yüzde oranını ve hemogloblin miktarını azalttığı (Gluszczak ve ark. 2006) ya da tam tersi bu değerleri artırdığı (Modesto ve Martinez 2010) bildirilmektedir. Biyolojik membranlar, hücre ve çevresi arasında etkili bir bariyer olması nedeniyle hücreye sızan zehirli bileşiklerin üstesinden gelmesi gereken ilk savunma bölgesini oluşturmaktadır. Herbisitlerin hücre zarına dahil olarak yapı ve işlevini bozabilecekleri ileri sürülmektedir (Suwalsky ve ark.1996). Vücutta normal metabolik reaksiyonların yan ürünleri olarak reaktif oksijen türleri (ROS) oluşmakta ve pestisitlere maruz kalmak bunların oluşumunu hızlandırmaktadır (Nakbi ve ark. 2010). Nitekim, 2,4-D uygulanan sıçanlarda eritrosit antioksidan enzim aktivitelerinin azaldığı ve lipid peroksidasyon düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Nakbi ve ark. 2010). Bununla birlikte, hücresel membranda meydana gelen değişiklikler sadece lipidleri etkilemekle kalmaz aynı zamanda membran proteinlerini de etkileyebilir. Nitekim, Duchnowicz ve Koter (2002), herbisitlerin eritrosit membranında yol açtığı zararlara yönelik in vitro yaptıkları çalışmada; hemolizde bir artış gözlemlenmiş ve bunun herbisitlerin membran proteinlerine verdiği zarardan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada; 2,4-D verilen sıçanlardaki eritrosit sayısı kontrol

grubundakilere göre önemsiz düzeyde düşük olduğu, ancak alkol ve 2,4-D'nin birlikte verildiği sıçanlarda ise diğer gruplardan önemli düzeyde daha düşük olduğu gözlemlendi. Bu durum hem alkol hem de 2,4-D uygulamasının serbest radikal üretimini artırarak eritrositlerin zar dayanıklılığını azaltması (Nakbi ve ark. 2010) ya da 2,4-D'nin eritrosit membran proteinlerine doğrudan etkisi (Duchnowicz ve Koter 2002) nedeniyle hemolize yol açmasından kaynaklanabileceği söylenebilir. Nitekim, daha önce yapılan bir çalışmada (Nakbi ve ark. 2010), eritrosit membranlarının yağ asidi bileşiminin 4 hafta boyunca 2,4-D maruz kalmasıyla değişebileceği bildirilmektedir.

Alkol tüketimi ile trombosit sayısı arasındaki ilişki hakkında bilgi oldukça sınırlıdır. Daha önce yapılan çalışmalarda; alkol kullanımının trombosit agregasyonunu kısıtladığı ve trombosit sayısının genellikle alkol kullanımına bağlı bozukluğu olan kişilerde azaldığı bildirilmektedir (Rubin ve Rand, 1994). Smith ve ark. (1992) kobaylara 4 hafta boyunca ad libitum etanol (%2,5) uygulaması yaptıkları araştırmada, trombosit sayısının %16 oranında azaldığını gözlemlenmişlerdir. Bu çalışmada, alkol ve 2,4-D uygulamasının her birisinin trombosit sayılarını azalttığı ve bu azalmayı birlikte kullanımlarının ise istatistiksel anlamda önemli olmayan ilave bir düşmeye götürdüğü bulundu. Bu bulgunun, alkol tüketimine bağlı kan trombosit düzeyinin düştüğü yönündeki bildirimlerle (Smith ve ark. 1992, Rubin ve Rand 1994) uyumlu olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte, çalışmada; kandaki trombositlerin ortalama boyutu (MPW), trombosit dağılım genişliği (PDW) ve prokalsitonin (PCT) düzeyleri bakımından gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı saptandı.

Sonuç olarak, çalışmada; 2,4-D'nin kanda lökosit sayısını artırdığı ancak eritrosit sayısını etkilemediği, alkol uygulamasının eritrosit sayısını düşürdüğü ve alkolle birlikte 2,4-D uygulamasının ise yalnız alkol uygulaması yapılan hayvanlardakilere göre; kanda eritrosit sayısı, hemogloblin miktarı ve hematokrit düzeyi ile trombosit sayısını daha fazla düşürdüğü gözlemlenmiştir. Bu bulgular, alkol kullanan kişilerin herbisite maruz kalmaları halinde, alkol kullanımına bağlı şekillenen hematolojik değişikliklerin daha da kötüye gidebileceğine ve oksijen taşıma kapasitelerinin olumsuz etkilenebileceğine işaret etmektedir.

TEŞEKKÜR

- *4th International Agriculture Congress 05 - 08 July 2018 özet bildiri olarak sunulmuştur.*
- *Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 13.03.2018 tarihli AKÜHADYEK-25-18 Referans no ile Onaylanmıştır.*

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKÇA

- Amel N, Wafa T, Samia D, Yousra B, Issam C, Cheraif I, Mohamed H. Extra virgin olive oil modulates brain docosahexaenoic acid level and oxidative damage caused by 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid in rats. *Journal of food science and technology*, 2016; 53: 1454-1464.
- Armutcu F, Gürel A, Kurtman S, Mungan AG, Ünalacak M. Alkol Alışkanlığı olanlarda lipid peroksidasyonu ve serum demir parametreleri. *Türk Klin. Biyok. Derg.* 2003; 2: 61-67.
- Bortolozzi AA, Evangelista de Duffard AM, Duffard RO and Antonelli MC. Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure on dopamine D2-like receptors in rat brain. *Neurotoxicology and Teratology*, 2004; 26: 599-605.
- Duchnowicz P, Koter M. Damage to the erythrocyte membrane caused by chlorophenoxyacetic herbicides. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 2002; 7 (Supp): 180.
- Figgs LW, Holland NT, Rothman N, Zahm SH, Tarone RE, Hill R, Vogt RF, Smith MT, Boysen CD, Holmes FF, VanDyck K, Blair A. Increased lymphocyte replicative index following 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide exposure. *Cancer Causes Control*, 2000; 11: 373-380.
- Gholami-Seyedkolaei SJ, Mirvaghefi A, Farahmand H. & Kosari AA. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2013; 98: 135-141.
- Gluszczak L, Miron DS, Crestani M, Fonseca MB, Pedron FA, Duarte MF, Vieira VLP. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2006; 65: 237-241.
- Hayes HM, Tarone RE, Cantor KP, Jessen CR, McCurnin DM and Richardson RC. Case Control Study of Canine Malignant Lymphoma: Positive Association With Dog Owner's Use of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides, The Nat. Cancer Institute. 1991; 83: 1226-1231.
- Hill RH, Head SL, Baker S, Gregg M, Shealy DB, Bailey SL, Williams CC, Sampson EJ, Needham LL. Pesticide residues in urine of adults living in the United States: reference range concentrations. *Environ. Res.* 1995; 7: 99-108.
- Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, Hashimoto H, Nagai R, Yamakado M. Association between white blood cell count and carotid arteriosclerosis in Japanese smokers. *Atherosclerosis*. 2004; 175: 95-100.
- Kamoun Z, Kamoun AS, Bougatef A, Kharrat RM, Youssfi H, Boudawara T & Zeghal N. Hepatoprotective and nephroprotective effects of sardinelle (*Sardinella aurita*) protein hydrolysate against ethanol-induced oxidative stress in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017; 24: 1432-1441.
- Leonard C, Burke CM, O'Keane C and Doyle JS. Golf ball liver: Agent Orange Hepatitis, 1997; <http://gut.bmjournals.com/cgi/reprint/40/5/687>. (Erişim tarihi: 10.01.2018).
- Lerda D, Rizzi R. Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Mutat Res.*, 1991; 262: 47-50.
- Linge HM, Ochani K, Lin K, Lee JY, Miller EJ. Age-dependent alterations in the inflammatory response to pulmonary challenge. *Immunol. Res.*, 2015; 63: 209-215.
- Modesto KA, Martinez CB. Effects of roundup transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 2010; 81: 781-787.
- Nakbi A, Tayeb W, Dabbou S, Issaoui M, Grissa AK, Attia N, Hammami M. Dietary olive oil effect on antioxidant status and fatty acid profile in the erythrocyte of 2,4-Dexposed rats. *Lipids in Health and Disease*, 2010; 9: 89-99.
- Pei C, Chang JB, Hsieh CH, Lin JD, Hsu CH, Pei D, Liang YJ, Chen YL. Using white blood cell counts to predict metabolic syndrome in the elderly: A combined cross-sectional and longitudinal study. *Eur. J. Intern. Med.*, 2015; 26: 324-329.
- Potter BJ. Alcohol and hepatic iron homeostasis. In: Watson RR. Editor. *Drug and alcohol abuse reviews: vol. 2. Liver Pathology and Alcohol*, Humana Press, Totowa: NJ, Pp; 1991; 1-60.
- Rubin R, Rand ML. Alcohol and platelet function. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, 1994; 18: 105-110.
- Saghir SA, Marty MS, Zablony CL, Passage JK, Perala AW, Neal BH, Hammond L, Bus JS. Life-stage-, sex-, and dose-dependent dietary toxicokinetics and relationship to toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in rats: implications for toxicity test dose selection, design, and interpretation. *Toxicol Sci*, 2013; 136: 294-307.
- Salaspuro M. Conventional and coming laboratory markers of alcoholism and heavy drinking. *Alcohol Clin Exp Res*, 1986; 10: 5- 12.

- Shaper AG, Pocock SJ, Ashby D, Walker M, Whitehead TP.** Biochemical and haematological response to alcohol intake. *Ann Clin Biochem*, 1985; 22: 50-61.
- Smith CM, Tobin JD Jr, Burris SM, White JG.** Alcohol consumption in the guinea pig is associated with reduced megakaryocyte deformability and platelet size. *J. Lab. Clin. Med.* 1992; 120: 699–706.
- Song Y.** Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J Integr Plant Biol*, 2014; 56(2): 106–113.
- Suwalsky M, Benites M, Villena F, Aguilar F, Sotomayor CP.** Interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) with cell and model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; 1285: 267–276.
- Tan B, Babur E, Koşar B, Varol S, Dursun N, Süer C.** Age-dependent evaluation of long-term depression responses in hyperthyroid rats: Possible roles of oxidative intracellular redox status. *Brain research*, 2019; 1720: 146314.
- Taşlıdere E, Kuruş M, Kazancı A, Otlu A.** Sıçanlarda Özefagus ve Midede Yaşa Bağlı Değişimlerin Histomorfolojik Açından İncelenmesi. *Fırat Tıp Dergisi*, 2013; 18(2): 75-82.
- Tayeb W, Nakbi A, Chargui I, Cheraief I, Miled A, Hammami M.** Subacute effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide on antioxidant defense system and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2011; 99: 256–264.
- Teixeira MC, Duque P and Sa'Correia I.** Environmental genomics: mechanistic insights into toxicity of and resistance to the herbicide 2, 4-D. *Trends in Biotechnology.* 2007; 25: 363–370.
- Temel İ, Özerol E, Bay A, Çiğli A.** Erythrocyte catalase activities in alcohol consumption, medications and some diseases. *Inönü Üni. Tıp Fak. Derg.*, 2002; 9: 11-14.
- Tiryaki O, Canhilal R, Horuz S.** Tarım ilaçları kullanımı ve riskleri. *Erciyes Ün. Fen Bil.Derg.*, 2010; 26: 154-169.
- Tyulina OV, Prokopieva VD, Dodd RD, Hawkins JR, Clay SW, Wilson DO, Boldyrev AA, Johnson P.** In vitro effects of ethanol, acetaldehyde and fatty acid ethyl esters on human erythrocytes. *Alcohol Alcohol*, 2002; 37: 179-186.
- Tyulina OV, Huentelman MJ, Prokopieva VD, Boldyrev AA, Johnson P.** Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis? *Biochim. Biophys., Acta*, 2000; 1535: 69-77.
- Uyanıkgil Y, Ates, U, Baka M, Bicer S, Oztas, E, Ergen G.** Immunohistochemical and histopathological evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced changes in rat kidney cortex. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009; 82(6): 749–755.
- Vural N.** Toksikoloji. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları*, 2005; 73: 381.
- Yılmaz B.** Fziyoloji, II.Basım, Feryal Matbaacılık, Ankara. 2000; 45-133.

First Molecular Characterization of *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metacercariae Infecting the Gills of Chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey

Emrah ŞİMŞEK^{1*}, Alparslan YILDIRIM², Abdullah İNCİ², Önder DÜZLÜ², Erdal YILMAZ¹, Zuhale ÖNDER², Arif ÇİLOĞLU², Gökmen Zafer PEKMEZCİ³

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, 38039, Kayseri, Turkey

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, 38039, Kayseri, Turkey

³Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, 55200, Samsun, Turkey

ABSTRACT

Posthodiplostomum Dubois, 1936 species have worldwide distribution. Metacercariae of *P. cuticola* that is common in Europe causes “black spot” disease in freshwater fishes. A limited number of data on mitochondrial and ribosomal sequences of *P. cuticola* are available in the GenBank. In addition, there is no sequencing data on trematodes belonging to genus of *Posthodiplostomum* in Turkey. The aim of this study was to investigate the presence of *Posthodiplostomum* metacercariae in freshwater chubs (*Squalius cephalus*) and to reveal the molecular characterization of mt-COI and ITS-2 gene regions of the identified isolates. *Posthodiplostomum* metacercariae were detected in the gills of two (1.6%) out of 123 fish. The ITS-2 gene sequences of the isolates (POSTC1-C2) (MN701652-3) found in this study showed 99.8-100% identity with *P. cuticola* sequences isolated from skin, muscle and fins of different fish species in Czech Republic and Hungary. In addition, the mt-COI gene sequences of the POSTC1-C2 isolates (MN700658-9) showed 99.1-98.9% identity with *P. cuticola* isolate (cercariae) (KX931424) from *Planorbis planorbis* in Lithuanian. This study provides first molecular and phylogenetic characterization of *P. cuticola* isolates found in chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey.

Keywords: ITS-2 and mt-COI gene regions, Molecular characterization, *Posthodiplostomum cuticola*, *Squalius cephalus*, Turkey.

Türkiye’de Tatlı Su Kefali’nin (*Squalius cephalus*) Solungaçlarını Enfekte Eden *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metaserkerlerinin İlk Moleküler Karakterizasyonu

ÖZ

Posthodiplostomum Dubois, 1936 türleri dünya genelinde oldukça yaygınlık göstermektedirler. Avrupa’da yaygın olan *P. cuticola* türünün metaserkeri tatlı su balıklarında siyah nokta “black spot” hastalığına sebep olmaktadır. GenBank veri tabanında *P. cuticola* türüne ilişkin mitokondriyal ve ribozomal sekans kaydı sınırlıdır. Diğer yandan, Türkiye’de *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodların sekans karakterizasyonuna dair herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada, tatlı su kefallerinde (*Squalius cephalus*) *Posthodiplostomum* metaserkerlerinin araştırılması ve tespit edilen izolatların mt-COI ve ITS-2 gen bölgelerinin moleküler karakterizasyonlarının yapılması amaçlanmıştır. İncelenen 123 balıktan ikisinin (%1,6) solungaçlarında *Posthodiplostomum* metaserkerleri saptanmıştır. Çalışmada tespit ettiğimiz izolatların (POSTC1-C2) (MN701652-3) ITS-2 gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, Çek Cumhuriyeti ve Macaristan’da farklı balık türlerinin deri, kas ve yüzgeçlerinden izole edilen *P. cuticola* izolatları ile %99,8-100 arasında identiklik göstermiştir. Yine POSTC1-C2 izolatlarının (MN700658-9) mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, Litvanya’da *Planorbis planorbis*’te bulunan *P. cuticola* izolatı (serker) (KX931424) ile %99,1-98,9 oranında identik bulunmuştur. Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez tatlı su kefallinde (*Squalius cephalus*) bulunan *P. cuticola* izolatlarının moleküler ve filogenetik karakterizasyonları ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: ITS-2 ve mt-COI gen bölgeleri, Moleküler karakterizasyon, *Posthodiplostomum cuticola*, *Squalius cephalus*, Türkiye.

To cite this article: Şimşek E, Yıldırım A, İnci A, Düzlü Ö, Yılmaz E, Önder Z, Çiloğlu A, Pekmezci G.Z. First Molecular Characterization of *Posthodiplostomum cuticola* (von Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda: Diplostomidae) Metacercariae Infecting The Gills of Chubs (*Squalius cephalus*) in Turkey. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):45-51.

Submission: 20.11.2019 Accepted: 27.01.2020 Published Online: 10.02.2020

ORCID ID; EŞ: 0000-0002-0492-9840, AY: 0000-0001-9868-0363, Aİ: 0000-0003-1614-0756, ÖD: 0000-0002-6951-0901, EY: 0000-0001-6348-3618, ZÖ: 0000-0002-6143-3630, AÇ: 0000-0003-2695-7102, GZP: 0000-0002-7791-1959

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

GİRİŞ

Posthodiplostomum Dubois, 1936 cinsinde yer alan türler dünya genelinde oldukça yaygınlık göstermektedirler (Niewiadomska 2002). Yaşam döngülerinde salyangozlar (birinci ara konak), balıklar (ikinci ara konak) ve balıkla beslenen kuşlar (son konak) olmak üzere üç konak bulunmaktadır (Dönges 1964). *Posthodiplostomum* sp. ile enfekte balıklarda gelişme geriliği ve ağırlık kaybı gözlenmekle birlikte, oluşan lezyonlara bağlı olarak, balıkların pazar kalitesi düşmektedir (Lane ve Morris 2000). Bunun yanı sıra metaserkerlerle enfekte balıklar son konak olan kuşlara daha kolay yem olabilmektedir (Ondračková ve ark. 2006).

Avrupa'da çeşitli balık türlerinde *P. cuticola* (von Nordmann 1832) Dubois, 1936 ve *P. brevicandatum* (von Nordmann 1832) Dubois, 1936 olmak üzere iki tür tanımlanmış ve yalnızca bu iki türün varlığı kabul ediliyorken, son yıllarda yapılan moleküler tabanlı çalışmalarda daha çok Kuzey Amerika'da yaygınlık gösteren *P. minimum* (McCallum 1921) Dubois, 1936 ve *P. centrarchi* Hoffman, 1958 türlerinin de Avrupa'da farklı konak türlerinde varlığı ortaya çıkarılmıştır (Kvach ve ark. 2017, Stoyanov ve ark. 2017). Moleküler veriler Kuzey Amerika, Avrupa ve Asya gibi farklı coğrafyalarda doğal enfekte konaklardan izole edilen trematod türlerinin doğru bir şekilde tür identifikasyonlarının yapılmasında, gelişim dönemleri arasındaki ilişkilerin kurulmasında ve doku/konak spesifitelerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmıştır (Moszczyńska ve ark. 2009, Locke ve ark. 2010, Nguyen ve ark. 2012, Stoyanov ve ark. 2017, Kvach ve ark. 2017, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019). Bunun yanı sıra moleküler tabanlı çalışmalar kriptomik türlerin tanımlanmasını, trematod çeşitliliğinin belirlenmesini ve yaşam döngülerinin daha iyi anlaşılmasını da sağlamıştır (Poulin 2011).

Avrupa'da yaygınlık gösteren *P. cuticola* türünün metaserkerleri Türkiye'de Eber ve Sapanca Gölü'nden yakalanan sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında morfolojik olarak tespit edilmiştir (Öztürk 2005, Uzunay ve Soylu 2006). Bunun dışında Aşağı Kızılırmak Deltasından yakalanan *Neogobius fluviatilis* ve *Proterorhinus marmoratus* balık türlerinde morfolojik olarak *Posthodiplostomum* sp. rapor edilmiştir (Güven ve Öztürk 2018). Ancak, bugüne kadar Türkiye'de *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodlar üzerine moleküler tabanlı araştırmaların yapılmadığı dikkati çekmiştir. Günümüzde *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan trematodların tür teşhislerinin doğru bir şekilde yapılabilmesi için mt-COI ve ITS gen bölgelerinin PCR ve sekans analizleri sıklıkla kullanılmaktadır (Stoyanov ve ark. 2017, Boone ve ark. 2018, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019). Bu çalışmada, tatlı su kefalinde (*Squalius cephalus*) bulunan *Posthodiplostomum* izolatlarının mt-COI ve

ITS-2 gen bölgelerinin sekans analizleri yapılarak Türkiye'deki ilgili parazit nesilleri için ilk moleküler karakterizasyon verileri ortaya çıkarılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Örneklerin Toplanması ve Parazitolojik İncelemeler

Kasım 2016 ve Kasım 2018 tarihleri arasında İç Anadolu Bölgesi, Kayseri İli'ndeki yerel balıkçılardan satın alınarak uygun taşıma koşullarında Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Su Ürünleri ve Hastalıkları Laboratuvarına getirilen toplam 123 adet tatlı su kefal (*Squalius cephalus*) parazitolojik açıdan incelenmiştir. Balıkların vücut yüzeyleri, yüzgeçleri ve solungaçları stereo mikroskop (Olympus SZX10 Tokyo, Japan) altında dikkatlice incelendikten sonra nekropsileri gerçekleştirilmiştir. Tüm balıkların karın boşlukları, iç organları ve kas dokuları ayrı ayrı metaserker varlığı açısından muayene edilmiştir. Siyah görümlü kistlere yalnızca solungaçlarda rastlanmıştır. Solungaçlardan toplanan kistler fizyolojik tuzlu su içerisinde doku artıklarından temizlendikten sonra moleküler analizlerde kullanılmak üzere %70'lik alkol içerisinde +4°C'de saklanmıştır.

Metaserkerlerden Genomik DNA İzolasyonu, ITS-2 ve mt-COI Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Alkolü uzaklaştırılan metaserkerlerin genomik DNA (gDNA) ekstraksiyonları ticari kit (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve elde edilen gDNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

Örneklerden izole edilmiş olan gDNA ekstraktları, metaserkerlerin ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerini amplifiye eden OPHE_T_Fwd/OPHE_T_Rev (Skov ve ark. 2009) ve Dice1F/Dice11R (Van Steenkiste ve ark. 2015) primerleri ile PCR analizlerine tabii tutulmuştur. PCR reaksiyon karışımı 25 µl final konsantrasyonda; 12,5 µl ticari master mix (Maxima Hot Start PCR Master Mix, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 0,5 µM her bir primer ve 10-50 ng gDNA içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR cihazında (Applied Biosystems, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) protokoller; mt-COI gen bölgesi için Van Steenkiste ve ark. (2015)'a göre ayarlanmış, ITS-2 gen bölgesi için ise 95°C'de 4 dk; 30 siklus, denatürasyon: 95°C'de 30 sn, bağlanma: 52°C'de 30sn, uzama: 72°C'de 1 dk ve final uzama: 72°C'de 10 dk olacak şekilde belirlenmiştir. Amplifikasyon sonunda elde edilen PCR ürünleri (10 µl) SafeView™ (Applied Biological Materials Richmond, BC, Canada) ile boyanarak %1,5 'luk agaroz jelde elektroforeze tabii tutulmuş, jel görüntülemeleri ve analizleri Quantum CX5 jel dökümantasyon sisteminde (Vilber Lourmat, France) gerçekleştirilmiştir.

DNA Dizi (Sekans) ve Filogenetik Analizleri

Ticari kit (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche, Germany) kullanılarak jelden pürifiye edilen her bir gen bölgesine ait PCR ürünleri, ilgili forward ve reverse primerleri ile çift yönlü olarak sekanslanmıştır (Macrogen, Amsterdam). İzolatların elde edilen çift yönlü DNA dizilerinin kromotogram kalite skorları dikkate alınarak Geneious 11.0.2 yazılımında forward ve reverse dizilimleri birleştirilmiş ve metaserkerlere ait final dizilimler elde edilmiştir (Kearse ve ark. 2012). Final dizilimlerinin Geneious 11.0.2 yazılımı üzerinden BLASTn analizleri gerçekleştirilerek metaserkerlerin tür identifikasyonları yapılmıştır (Kearse ve ark. 2012). Daha sonra GenBank'a, farklı coğrafik bölgelerden kaydedilmiş *Posthodiplostomum* türleri ve yakın cinsler içerisinde yer alan bazı izolatlar seçilerek, her iki gen bölgesi için veri setleri oluşturulmuş ve Geneious 11.0.2 yazılımında çoklu hizalamaları yapılmıştır (Kearse ve ark. 2012). MEGA 7.0 genetik yazılımı üzerinden Kimura two-parameter modeli kullanılarak tür içi ve arası nükleotid farklılıkları (%) belirlenmiştir (Kimura 1980, Kumar ve ark. 2016).

Filogenetik ilişkilerin belirlenmesinde, Geneious 11.0.2 yazılım programında JC+G (ITS-2) ve GTR+G (mt-COI) modellerini temel alan Bayesian (BA) [MrBayes version 3.2.6 (Huelsenbeck ve Ronquist 2001)] analizi uygulanmıştır (Kearse ve ark. 2012). Sekans evrimi için en uygun DNA modelleri Akaine Information Criterion (AIC) kriterlerine göre MEGA 7.0 genetik yazılımında belirlenmiştir (Kumar ve ark. 2016).

Tylodelphys mashonensis [KC685363 (ITS); KR863382 (mt-COI)] her iki filogenetik ağaçta dış dal olarak kullanılmıştır. Karakterizasyonu sağlanan *P. cuticola* izolatlarının (POSTC1-C2) ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerine ait DNA dizileri (ITS-2; MN701652-3 ve mt-COI; MN700658-9) erişim numaralarıyla GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

BULGULAR

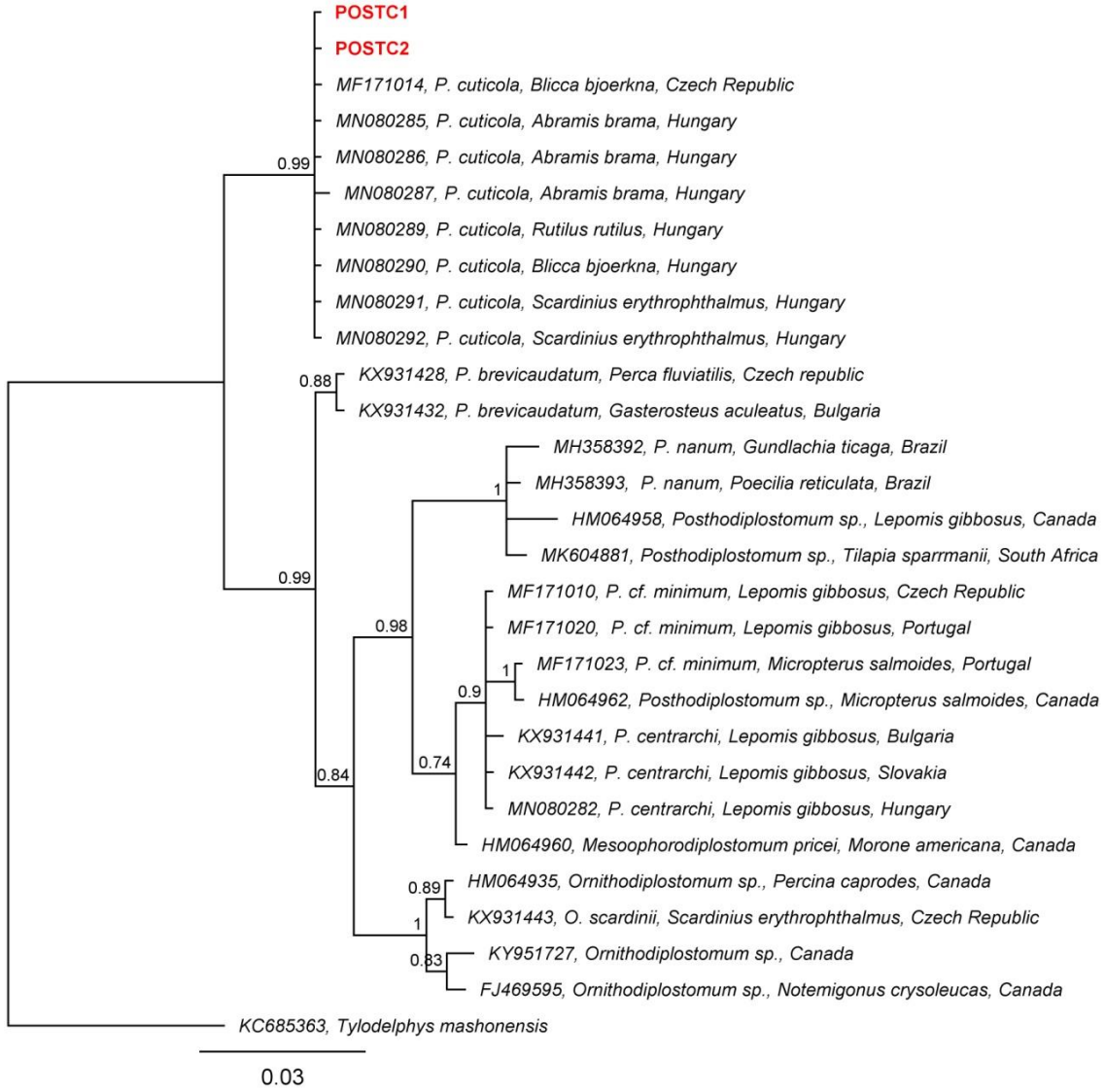
İncelenen 123 balıktan ikisinin (%1,6) solungaçlarında birer adet olmak üzere *Posthodiplostomum* sp. metaserkeri bulunmuştur. Kistler stereo mikroskop altında dikkatlice patlatılarak metaserkerlerin serbest kalması sağlanmıştır. Serbest kalan metaserkerlerin vücut yapılarının deforme olduğu görülmüş ve morfolojik yapıları görüntülenememiştir. İzolatların ITS-2 ve mt-COI gen bölgelerine ait sekansları başarıyla elde edilmiştir. Metaserkerlerin her iki gen bölgesine ait sekansları, BLASTn analizine göre *P. cuticola* olarak tanımlanmış ve POSTC1-C2 izolat isimleriyle GenBank veri tabanına kaydedilmiştir.

POSTC1-C2 izolatlarının ITS-2 gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda 444bp uzunluğunda DNA dizisi

elde edilmiştir. ITS-2 gen bölgesine ait veri seti oluşturulurken çoklu hizalamaları yapılan izolatların dizi uzunlukları 444bp olarak düzenlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatların ITS-2 nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılık saptanmamıştır. ITS-2 gen bölgesine göre çalışmada bulunan izolatlar, Çek Cumhuriyeti'nde *Leuciscus cephalus* ve *Blicca bjoerkna*'dan, Macaristan'da *Abramis brama*, *Rutilus rutilus*, *B. bjoerkna* ve *Scardinius erythrophthalmus*'tan rapor edilen *P. cuticola* (MF171014-16; MN080286,89-92) izolatları ile %100 identiklik gösterirken, yine Macaristan'da *A. brama*'dan bildirilen *P. cuticola* (MN080287) izolatı ile %0,2 nükleotid farklılığı göstermiştir. ITS-2 veri setine dahil edilen ve farklı coğrafik bölgelerden GenBank'a kayıtları gerçekleştirilmiş *P. nanum*, *P. cf. minimum*, *P. centrarchi* ve *P. brevicaudatum* türleriyle POSTC1-C2 izolatları arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla %4,2-6,7; %7,1-7,7; %4,8-6,4; %3,7 aralığında belirlenmiştir. Bunun yanı sıra yine GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. olarak kaydedilmiş izolatlar ile bu çalışmadaki izolatlar arasında %4,8-8 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür.

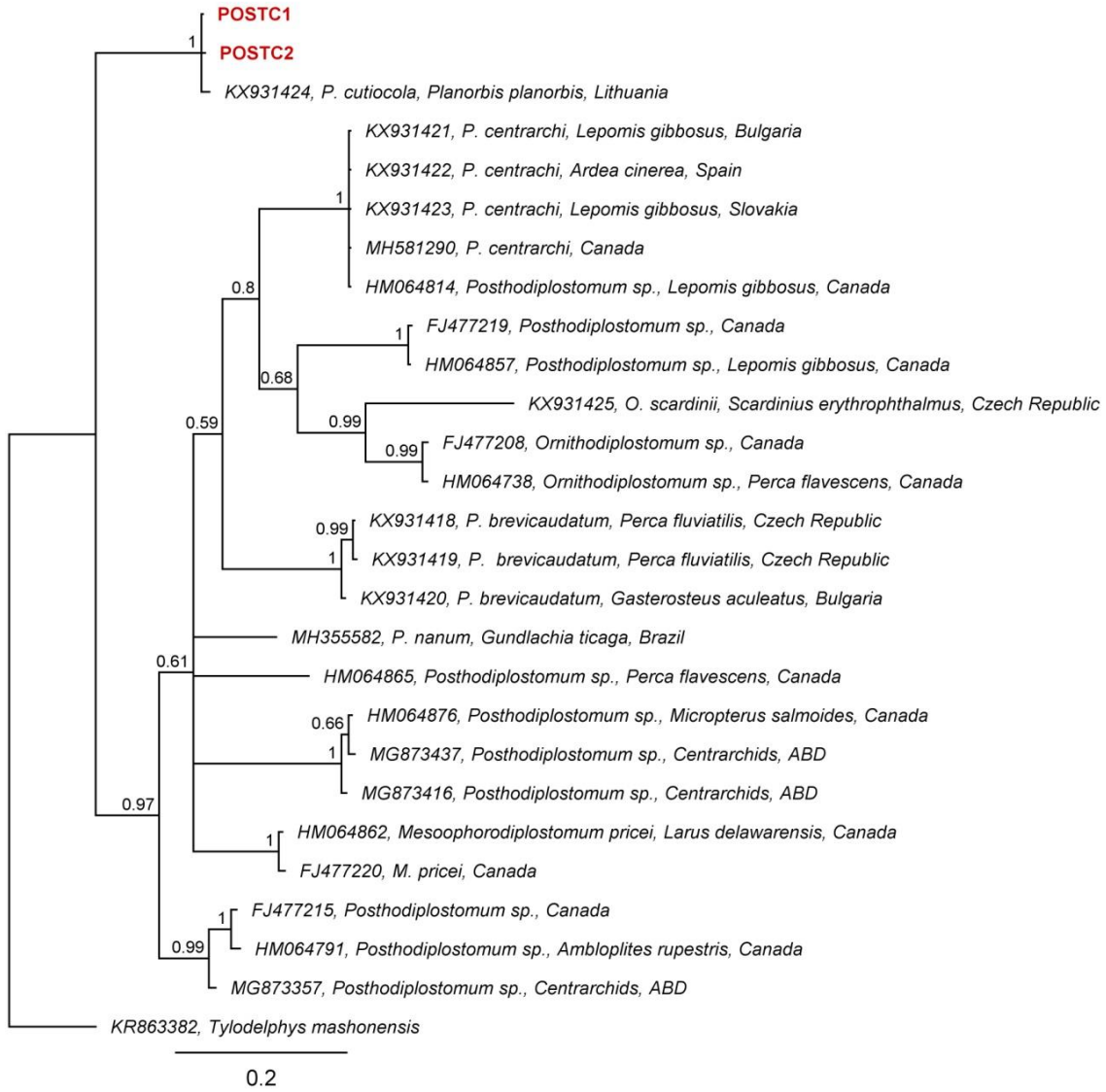
POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesinin sekans analizleri sonucunda 577bp uzunluğunda DNA dizisi elde edilmiştir. Mt-COI gen bölgesine ait veri seti oluşturulurken çoklu hizalamaları yapılan izolatların dizi uzunlukları 352bp olarak düzenlenmiştir. Çalışmada karakterize edilen izolatların mt-COI nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılıkları %0,3 olarak belirlenmiştir. POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri, BLASTn analizlerine göre, Litvanya'da *Planorbis planorbis*'te bulunan KX931424 erişim numaralı izolatla (serker) %98,9-99,1 oranında identik bulunmuştur. Mt-COI veri setine dahil edilen ve farklı coğrafik bölgelerden GenBank'a kayıtları gerçekleştirilmiş *P. nanum*, *P. centrarchi* ve *P. brevicaudatum* türleriyle POSTC1-C2 izolatları arasındaki nükleotid farklılıkları sırasıyla %19; %22-22,4; %25,5-26,3 aralığında belirlenmiştir. Bunun yanı sıra yine GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. düzeyinde kayıtları gerçekleştirilmiş izolatlar ile POSTC1-C2 izolatları arasında %16,7-25 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür. Mt-COI gen bölgesinin DNA dizi analizlerine göre *Posthodiplostomum* türleri arasındaki nükleotid farklılığın ITS-2'ye göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Her iki gen bölgesine ait filogenetik ağaçta iki ana cluster (dal) oluşmuştur. *Posthodiplostomum cuticola* izolatları kendi aralarında gruplanarak diğer *Posthodiplostomum* türlerinden farklı bir clusterda (dalda) yer almıştır (Şekil. 1 ve 2).



Şekil 1. *Posthodiplostomum* türlerinin ITS-2 gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri. *Tylodelphys mashonensis* (KC685363) dış dal olarak kullanılmıştır. Veri setine dahil edilen izolatlar GenBank erişim numaraları, tür ismi, konak ve ülkeleri ile verilmiştir. Çalışmada bulunan izolatlar (POSTC1-C2) kırmızı karakterde gösterilmiştir. Ölçek çizgisi %0,03 farklılığı göstermektedir.

Figure 1. Phylogenetic relationships among *Posthodiplostomum* species based on ITS-2 gene. *Tylodelphys mashonensis* (KC685363) was used as an out group. Isolates that is included in data sets were given with GenBank accession numbers, species names, hosts, and countries. The isolates (POSTC1-2) found in this study were shown with red character. Scale bar represents 0.03% substitutions per nucleotide position.



Şekil 2. *Posthodiplostomum* türlerinin mt-COI gen bölgesine göre filogenetik ilişkileri. *Tyloodelphys mashonensis* (KR863382) dış dal olarak kullanılmıştır. Veri setine dahil edilen izolatlar GenBank erişim numaraları, tür ismi, konak ve ülkeleri ile verilmiştir. Çalışmada bulunan izolatlar (POSTC1-C2) kırmızı karakterde gösterilmiştir. Ölçek çizgisi %0,2 farklılığı göstermektedir.

Figure 2. Phylogenetic relationships among *Posthodiplostomum* species based on mt-COI gene. *Tyloodelphys mashonensis* (KR863382) was used as an out group. Isolates that is included in data sets were given with GenBank accession numbers, species names, hosts, and countries. The isolates (POSTC1-2) found in this study were shown with red character. Scale bar represents 0.2% substitutions per nucleotide position.

TARTIŞMA

Avrupa’da yaygınlık gösteren *P. cuticola* türünün metaserkerleri ikinci ara konak balıklarda deri, kas ve yüzgeç gibi farklı dokulara yerleşerek melanosit birikimine bağlı olarak siyah nokta (“black spot”) hastalığına sebep olmaktadır (Dönges 1964). Bugüne kadar Türkiye’de, bu parazit türü ile ilgili yalnızca Aşağı Kızılırmak Deltası ile Eber ve Sapanca Göllerinden yakalanan birkaç farklı balık türünde (deri ve yüzgeçler) morfolojik düzeyde veriler bulunmaktadır. (Öztürk 2005, Uzunay ve Soylu 2006, Güven ve Öztürk 2018). *Posthodiplostomum cuticola* türüne ilişkin GenBank veri tabanında sınırlı sayıda sekans kaydı bulunmakla birlikte, Türkiye’den

Posthodiplostomum cinsinde yer alan trematodlara ait moleküler tabanlı herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışma ile tatlı su kefalinde (*Squalius cephalus*) tespit edilen *P. cuticola* izolatlarının (POSTC1-C2) Türkiye’de ilk kez mt-COI ve ITS-2 gen bölgelerinin sekans analizleri yapılarak moleküler karakterizasyonları sağlanmış ve GenBank kayıtları gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, balıkların solungaçlarında bulunan izolatlar, ITS-2 gen bölgesinin analizlerine göre Çek Cumhuriyeti’nde ve Macaristan’da farklı balık türlerinin deri, kas ve yüzgeçlerinden izole edilen *P. cuticola* (MF171014-16; MN080286,87,89-92) izolatları ile %99,8-100 arasında identiklik göstermiştir. Veri

setine dahil edilen *Posthodiplostomum* izolatlarının tür içi genetik farklılıkları %0,0-0,5 iken, türler arası farklılık %1,2-7,7 olarak belirlenmiştir. GenBank'a *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtları gerçekleştirilmiş izolatlar ile POSTC1-C2 izolatları arasında %4,8-8 nükleotid farklılığı olduğu görülmüştür. Çalışmada karakterize edilen izolatların mt-COI nükleotid dizilimleri arasındaki tür içi genetik farklılıkları %0,3 olarak belirlenmiştir. POSTC1-C2 izolatlarının mt-COI gen bölgesine ait nükleotid dizilimleri Litvanya'da *P. planorbis*'te bulunan *P. cuticola* izolatı (serker) ile (KX931424) %0,9-1,1 nükleotid farklılığı göstermiştir. Stoyanov ve ark. (2017)'nin da belirttiği gibi bu çalışmada da mt-COI gen bölgesine göre *Posthodiplostomum* türlerinde tür içi genetik farklılık (%0,0-1,7) türler arası farklılıktan (%16,5-26,3) oldukça düşük bulunmuştur. Bu durum mt-COI gen bölgesinin *Posthodiplostomum* türlerinin ayırımında kullanışlı bir belirteç olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmanın (Stoyanov ve ark. 2017) sonuçlarına benzer şekilde mt-COI gen bölgesinin DNA dizi analizlerine göre *Posthodiplostomum* türleri arasındaki nükleotid farklılığın ITS-2'ye göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Çalışmamızda her iki gen bölgesine ait filogenetik ağaçta parazit türleri iki ana dalda yer almıştır. *Posthodiplostomum cuticola* izolatları, çeşitli araştırmalardaki (Kvach ve ark. 2017, López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019) filogenetik yapılanmaya benzer şekilde kendi aralarında monofiletik olarak gruplanarak, diğer türlerden farklı bir dalda yer almış ve bu türün *Posthodiplostomum*'un evrimsel sürecinde ve taksonomisinde oldukça önemli bir yere sahip olduğu dikkati çekmiştir. Bazı çalışmalarda da belirtildiği gibi (López-Hernández ve ark. 2018, Hoogendoorn ve ark. 2019), GenBank veri tabanında *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtlı bir izolat (HM064962), *P. cf. minimum*, *P. centrarchi* izolatları ile %0,0-0,8, *Mesophorodiplostomum pricei* izolatı ile ise %0,8 nükleotid farklılığı göstermiş olup, ITS-2 filogenetik ağacında söz konusu izolatlar ile aynı grupta yer aldığı görülmüştür (posterior olasılık 0,74). Dolayısıyla, ITS filogenesi dikkate alındığında, *Posthodiplostomum* ve *Mesophorodiplostomum*'un sinonim olarak adlandırılabilirliği belirtilmiştir (López-Hernández ve ark. 2018). Yine GenBank veri tabanında *Posthodiplostomum* sp. olarak kayıtlı bazı izolatlar (FJ477219; HM064857) *Ornithodiplostomum* sp. ve *O. scardinii* izolatları (FJ477208; HM06473; KX931425) ile %16,7-22,4 nükleotid farklılığı göstererek, mt-COI filogenetik ağacında söz konusu izolatlar ile aynı grupta yer almıştır (posterior olasılık 0,68). Filogenetik analizler ışığında *Posthodiplostomum* cinsinde yer alan türler ile diğer yakın cinslerde bulunan trematodlar arasındaki filogenetik ilişkiler daha detaylı bir şekilde araştırılarak tür içi ve türler arası nükleotid farklılıkların kabul edilebilir aralığının belirlenmesi gerektiği kanısına varılmıştır. Nitekim López-Hernández ve ark. (2018) daha önce GenBank veri tabanına *Posthodiplostomum* olarak kayıtları yapılmış

olan bazı izolatların hatalı olabileceğini, yine bu cins içerisinde ya da *Mesophorodiplostomum* cinsi içerisinde yer alan bazı izolatların tekrardan tanımlanması gerektiğini vurgulamaktadırlar.

Sonuç olarak, bu çalışma ile *P. cuticola* izolatlarının Türkiye'de ilk kez moleküler ve filogenetik karakterizasyonları ortaya konulmuştur. Türkiye'de *Posthodiplostomum* türlerinin tür ve genetik çeşitliliğinin, birinci ara konak ve son konaklarının ve bu konaklardaki dağılımlarının belirlenmesi için daha geniş bir coğrafyada moleküler ve morfolojik yöntemlerin birlikte kullanıldığı çalışmaların yürütülmesi gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

➤ Bu çalışma, TCD-2016-6795 proje koduyla Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Boone EC, Laursen JR, Colombo RE, Meiners SJ, Romani MF, Keeney DB.** Infection patterns and molecular data reveal host and tissue specificity of *Posthodiplostomum* species in centrarchid hosts. *Parasitology*. 2018; 145(11):1458-1468.
- Dönges J.** Der Lebenszyklus von *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) Dubois, 1936 (Trematoda, Diplostomatidae). *Z Parasitenk*. 1964; 24(2):169-248.
- Güven A, Öztürk T.** Metazoan parasite faunas of three *Gobioid* species (Actinopterygii: Gobiidae) inhabiting the lower Kızılırmak Delta in Samsun: A comparative study. *Türkiye Parazit Derg*. 2018; 42: 33-38.
- Hoogendoorn C, Smit NJ, Kudlai O.** Molecular and morphological characterisation of four diplostomid metacercariae infecting *Tilapia sparmanii* (Perciformes: Cichlidae) in the North West Province, South Africa. *Parasitol Res*. 2019; 118: 1403-1416.
- Huelsenbeck JP, Ronquist F.** MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001; 17:754-755.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A.** Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012; 28:1647-1649.
- Kimura M.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol*. 1980; 16:111-120.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016; 33(7):1870-1874.
- Kvach Y, Jurajda P, Bryjová A, Trichkova T, Ribeiro F, Pňikrylová I, Ondračková M.** European distribution for metacercariae of the North American digenean *Posthodiplostomum cf. minimum centrarchi* (Strigeiformes: Diplostomidae). *Parasitol Int*. 2017; 66:635-642.

- Lane RL, Morris, JE. Biology, prevention and effects of common grubs (digenetic trematodes) in freshwater fish. Tech. Bull. 2000; 115: 1-6.
- Locke SA, McLaughlin JD, Marcogliese DJ. DNA barcodes show cryptic diversity and a potential physiological basis for host specificity among Diplostomoidea (Platyhelminthes: Digenea) parasitizing freshwater fishes in the St. Lawrence River, Canada. Mol Ecol. 2010; 19: 2813-2827.
- López-Hernández D, Locke SA, de Melo AL, Rabelo ÉML, Pinto HA. Molecular, morphological and experimental assessment of the life cycle of *Posthodiplostomum nanum* Dubois, 1937 (Trematoda: Diplostomidae) from Brazil, with phylogenetic evidence of the paraphyly of the genus *Posthodiplostomum* Dubois, 1936. Infect Genet Evol 2018; 63:95-103.
- Moszczyńska A, Locke S, McLaughlin J, Marcogliese D, Crease T. Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminths. Mol Ecol Resour. 2009; 9:75-82.
- Nguyen TC, Li YC, Makouloutou P, Jimenez LA, Sato H. *Posthodiplostomum* sp. metacercariae in the trunk muscle of northern snakeheads (*Channa argus*) from the Fushinogawa River, Yamaguchi, Japan. J Vet Med Sci. 2012; 74: 1367-1372.
- Niewiadomska K. Superfamily Diplostomoidea Poirier, 1886, In: Keys to the Trematoda, Ed; Gibson DI, Jones A, Bray RA, 1th Ed., CAB International and The Natural History Museum, UK. 2002; pp. 159-242.
- Ondračková M, Dávidová M, Gelnar M, Jurajda P. Susceptibility of *Prussian carp* infected by metacercariae of *Posthodiplostomum cuticola* (v. Nordmann, 1832) to fish predation. Ecol Res. 2006; 21: 526-529.
- Öztürk MO. Eber Gölü (Afyon)'ndeki Sazan (*Cyprinus carpio* L.)'ların metazoon parazitleri üzerine bir araştırma. Türkiye Parazitol Derg. 2005; 29(3):204-210.
- Poulin R. Uneven distribution of cryptic diversity among higher taxa of parasitic worms. Biol Lett 2011; 7: 241-244.
- Skov J, Kania PW, Dalsgaard A, Jørgensen TR, Buchmann K. Life cycle stages of heterophyid trematodes in Vietnamese freshwater fishes traced by molecular and morphometric methods. Vet Parasitol. 2009; 160:66-75.
- Stoyanov B, Georgieva S, Pankov P, Kudlai O, Kostadinova A, Georgiev BB. Morphology and molecules reveal the alien *Posthodiplostomum centrarchi* Hoffman, 1958 as the third species of *Posthodiplostomum* Dubois, 1936 (Digenea: Diplostomidae) in Europe. Syst Parasitol. 2017; 94:1-20.
- Uzunay E, Soylu E. Sapanca Gölü'nde yaşayan Sazan (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758) ve Karabalık (*Vimba vimba* Linnaeus, 1758)'ın metazoan parazitleri. Türkiye Parazitol Derg. 2006; 30(2):141-150.
- Van Steenkiste N, Locke SA, Castelin M, Marcogliese DJ, Abbott CL. New primers for DNA barcoding of digeneans and cestodes (Platyhelminthes). Mol Ecol Resour. 2015; 15:945-952.

Hand Hygiene Profile of Food Handlers in Canteens of Erciyes University Campus

Onur ÇATAR¹, Yeliz YILDIRIM^{2*}

¹Erciyes University, Institute of Health Sciences, Veterinary Food Hygiene and Technology, 38280, Kayseri, Turkey

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, 38280, Kayseri, Turkey

ABSTRACT

Foodborne bacterial diseases still occur as a result of improper handling practices by foodhandlers. The aim of this study was to evaluate food safety knowledge of food handlers' and to determine the presence of indicator bacteria on food handlers' hands in canteens and cafes in Erciyes University Campus, Kayseri. Total of 23 food handlers' were interviewed and their hands were sampled to determine the contamination. Food handlers' knowledge were evaluated by questionnaires and checklists. Conventional methods were followed for microbiological analyses. The presence of total coliforms, *E. coli*, *Enterobacteriaceae* and *S. aureus* were analyzed. Results indicated that coliforms were present in 73,91% of food handlers' hands, compared to the literature suggesting a target value of <2,5 cfu/cm², 40,47% exceeded the limit. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* and *S.aureus* were present in 56,52%, 82,6 % and 82,6 % of handlers' hands respectively. Food safety knowledge evaluation received high scores with mean score of 72,17%. In spite of the high scores on food safety knowledge, high numbers of hand samples were found to be contaminated with pathogens. It is needed to revise the current training model of food handlers', to ensure sustained training, to track the effectiveness of training and to carry out stringent surveillance programs at point of food sale.

Keywords: Erciyes University, Food handler, Food safety knowledge, Indicator bacteria, Canteens

Erciyes Üniversitesi Kampüsündeki Kantin Çalışanlarının El Hijyen Durumlarının Değerlendirilmesi

ÖZ

Gıda kaynaklı bakteriyel hastalıkların büyük bir çoğunluğunun gıda çalışanlarının yanlış uygulamalarından kaynaklandığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı Erciyes Üniversitesi kampüsünde bulunan kantinlerde çalışan personel ellerinde indikatör bakteri varlığının belirlenmesi ve personelin gıda güvenliği bilgilerinin değerlendirilmesidir. Bu amaçla toplam 23 kantinde gıda ile teması olan çalışanlarla görüşme yapılmış ve parmakları örneklenmiştir. Gıda güvenliği bilgileri; belirlenen anket soruları ve kontrol listeleriyle değerlendirilmiştir. Mikrobiyolojik analizler, konvansiyonel yöntemlerle yapılmış, el örnekleri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterobacteriaceae*, total koliform ve *Escherichia coli* (*E. coli*) açısından incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, çalışan ellerinden alınan örneklerin %73,91'inde koliform grubu belirlenirken, bunlardan %40,47'sinin literatürlerde belirlenen hedef değerlerin (<2.5 kob/cm²) üzerinde koliform içeriği belirlenmiştir. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* ve *S. aureus* ise incelenen örneklerin sırasıyla %56,52 ve %82,6 ve % 82,6'sında belirlenmiştir. Gıda güvenliği bilgi değerlendirme skoru genel olarak yüksek olmakla birlikte ortalama %72,17'lik bir değer elde edilmiştir. Sonuç olarak çalışanların gıda güvenliği bilgi değerlendirme sonuçları yüksek skorlar ortaya koymuş olmasına karşın, el örneklerindeki patojen kontaminasyon yüzdeleri yüksek bulunmuştur. Gıda çalışanlarına yönelik mevcut eğitim modelinin revize edilerek etkin bir şekilde uygulanması, sürekliliğinin sağlanması, eğitim etkinliğinin denetlenmesi ve gıda satış yerlerinde katı ve sürekli kontrol programlarının uygulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Erciyes Üniversitesi, Gıda çalışanı, Gıda güvenliği bilgisi, İndikatör bakteri, Kantinler.

To cite this article: Çatar O, Yıldırım Y. Hand Hygiene Profile of Food Handlers in Canteens of Erciyes University Campus. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):52-59.

Submission: 10.12.2019 Accepted: 01.02.2020 Published Online: 13.02.2020

ORCID ID; OÇ: 0000-0001-8343-6480, YY: 0000-0001-8783-3889

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

GİRİŞ

Gıda çalışanları arasında görünen bireysel hijyen yetersizliği, gıda kaynaklı hastalıkların oluşumunda rol oynayan en önemli faktörlerden biri olarak görülmektedir (Collins 2001, Cogan ve ark. 2002). Çoğu ülkede gıda işleme ve hijyen standartlarının gelişmesine, gıda çalışanlarının eğitimlerinin desteklenmesine ve tüketici farkındalığının artmasına karşın gıda kaynaklı hastalıklar halen halk sağlığı açısından önemli bir problem olarak varlığını sürdürmektedir (Dominguez ve ark. 2002).

Avrupa'nın gıda güvenliği otoritesi (EFSA 2010) 2008 yılında Avrupa Birliği'nde rapor edilen toplam 5332 gıda zehirlenmesi vakasının 45.622 kişiyi etkilediğini 6230 kişinin hastanede tedavi altına alındığı, 32 kişinin ise ölümüne yol açtığı belirtmektedir. Gıda zehirlenmesine yol açan kontaminasyonların başlıca nedenlerinin, gıda hazırlanması esnasında personel kaynaklı yetersiz ısı işlem uygulamaları, kontamine işlenmemiş katkı maddesi kullanımı, uygun olmayan gıda muhafaza yöntemlerinin kullanımı, yanlış ısı-zaman uygulamaları ve gıda işleme/hazırlama personelindeki enfeksiyonlar olduğu belirtilmektedir (Taylor ve ark. 2000, Angelillo ve ark. 2000, Rippel 2002, Yapp ve ark. 2006). Bu faktörler temelde gıda çalışanlarının gıda hijyeni bilgi ve uygulamaları konusunda yetersizliğine dolayısıyla gıda güvenliği konusunda insan kaynaklı risklere işaret etmektedir.

Avrupa Birliği'nin 852/ 2004 no'lu regülasyonuna göre gıda çalışanlarının gıda hijyeni konusunda eğitilmeleri yasal bir gereklilik olup, gıda ile temasta olan personelin yaptıkları işe göre gıda hijyeni alanında eğitilmeleri ve denetlenmeleri teminat altına alınmıştır. Bununla birlikte son zamanlarda İngiltere, İrlanda, Portekiz, Slovenya ve Türkiye'de yapılan çalışmalar gıda çalışanlarının hijyen bilgi ve uygulamalarının iyileştirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır (Walker ve ark. 2003, Baş ve ark. 2006, Bolton ve ark. 2008, Jevsnik ve ark. 2008, Tokuç ve ark. 2009, Gomes-Neves ve ark. 2011).

Küçük ve orta ölçekli işletmelerde önerilen eğitim programlarının yeterince etkili olamamasında bir çok neden sıralanabilmekle birlikte özellikle personelin eğitim seviyesinin düşük olması (Çakıroğlu ve Uçar 2008), sürekli iş değiştirme (Burch ve Sawyer 1991) mevsimsel işçilik (Travis 1986) ve düşük maaş ve statü dolayısıyla yaşanan motivasyon eksikliği ön sıralarda yer almaktadır (Rennie 1994).

Bu çalışmanın amacı, Erciyes Üniversitesi kampüsünde yer alan kantinlerde gıda hazırlamada görevli çalışanların gıda güvenliği bilgi ve uygulamalarını ve el hijyen durumlarını

değerlendirmektir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, gıda çalışanlarının gıda güvenliği konusunda eğitilmeleri ve gereken önlemlerin alınması yolunda adımlar atılmasının gerekli olup olmadığı ortaya konulmuştur.

MATERYAL ve METOT

Erciyes Üniversitesi kantinlerinde gıda hazırlamada çalışan personelin her iki eline ait, başparmak ve işaret parmağını örneklemek için selektif agar içeren RODAC petripleri kullanıldı. El örneklemeleri, önceden haber verilmeden gidilen işletmelerde herhangi bir el yıkama yapılmadan, çalışanların eldivensiz olarak direkt olarak ellerinden ve iş mesaisi esnasında (10:00-14:00) yapıldı. Bu amaçla işaret parmağı için *S. aureus* izolasyonunda kullanılan Baird-Parker Agar (Oxoid CM 0275) içeren RODAC petripleri kullanıldı. Söz konusu petriplerde etrafı beyaz haleli siyah koloniler tipik *S. aureus* kolonileri olarak değerlendirildi ve koloniler koagülaz test (Oxoid, Staphytest test kit) ile doğrulandı. Çalışanların başparmaklarında, total koliform, *E. coli* ve Enterobacteriaceae familyasına ait bakteri türlerini tespit etmek amacıyla Chromocult koliform Agar (Merck 1.10426) içeren RODAC petripleri kullanıldı (Lues ve Van Tonder 2007). İnkubasyon sonucunda tipik somon-kırmızı renk koloniler koliform grubu bakteri, koyu mavi-mor menekşe renginde olanlar *E. coli* ve renksiz koloniler ise Enterobacteriaceae familyasına ait olarak değerlendirildi (Blood ve Curtis 1995, De Boer 1998).

Çalışmada kullanılan referans değerler; Koliform ve *E.coli* için sırasıyla Moore ve Griffith (2002) ve Legnani ve ark. (2004) tarafından kullanılmış olan değerlerdir.

Çalışma kapsamında analiz edilecek mikroorganizmaların hangi sıcaklıklarda ne sürede inkübe edildikleri Tablo 1'de görülmektedir (Tablo 1).

Anketlerin Uygulanması

Çalışmaya Erciyes Üniversite Kampüsü içinde yer alan 25 kantin dâhil edildi. Kantinlerde gıda güvenliği konusunda mikrobiyel kalite ile ilgili risk faktörlerine yönelik 23 sorudan oluşan anket uygulandı. Anket uygulamaları, mikrobiyolojik analizler için örnek toplama ile eş zamanlı yapıldı. Anket uygulamasında hedef, araştırma sonuçlarının güvenilir ve yansız bir şekilde tahmin edilmesini sağlayacak işletme sayısına ulaşmaktır. Gıda çalışanlarının anket sorularına verdikleri doğru yanıt yüzdeleri belirlendi. İlaveten gıda çalışanlarının demografik yapılarını belirlemeye yönelik bir diğer anket doldurulurken, gıda çalışanına ve kantin ortamına ilişkin düzenlenmiş olan kontrol listeleri de anket esnasında anketör tarafından doldurularak değerlendirilmeye alındı.

BULGULAR

Anket uygulanan çalışanlar için gıda güvenliği bilgi değerlendirme skoru %72,17 olarak belirlenmiştir (Tablo 2). Gıda çalışanlarının el hijyen analiz sonuçları Tablo 3'de verilmiştir. Kampüs içinde yer alan

kantinlerdeki gıda çalışanlarının demografik özellikleri Tablo 4'de özetlenirken çalışanların işyeri ortamında gözlenmeleri sonucu saptanan tutum ve durumlarına ilişkin gıda güvenliği bileşenleri de Tablo'5 de verilmiştir.

Tablo 1. Mikrobiyolojik analizlerde kullanılan besiyeri ve inkubasyon dereceleri

Table 1. The medium and incubation conditions in microbiological analysis

Mikroorganizma	İnkübasyon			Besiyeri
	Zaman (h)	Isı (°C)	Koloni Morfolojisi	
Enterobacteriaceae	24	35-37	Saydam (renksiz)	Chromocult Coliform Agar (Merck, 1.10426)
Total coliforms	24	35-37	somon-kırmızı	Chromocult Coliform Agar (Merck, 1.10426)
<i>E. coli</i>	24	35-37	koyu mavi-mor menekşe	Chromocult Coliform Agar (Merck, 1.10426)
<i>Staphylococcus aureus</i>	24-48	35-37	Beyaz haleli siyah	Baird- Parker Medium (Oxoid™) Egg Yolk-Tellurite Emulsion (Oxoid™)

Tablo 2. Erciyes Üniversitesi Kampüsünde kantin gıda çalışanlarının gıda güvenliği bilgisi

Table 2. Food safety information of canteen food workers at Erciyes University Campus

ANKET SORULARI	DOĞRU CEVAP %
1. Gıda ile temastan önce elleri yıkamak gıda zehirlenme riskini azaltır.	100
2. Gıdaya temastan önce eldiven giyilmelidir.	100
3. Mutfak malzemeleri her gün iyi bir şekilde yıkanıp durulanırsa gıda hastalık riski azalır.	100
4. İş yerinde, gıda çalışanlarının yiyecek içecek tüketmesi sattıkları gıdalara mikrop bulaşma riskini artırır.	72
5. Gıdalar bir gün önceden hazırlanırsa gıda, daha çabuk bozulur hastalık oluşturma riski artar.	92
6. Pişmiş gıda tekrar tekrar ısıtılıp tüketilirse gıdada mikrop üreme riski artar.	100
7. Gıdaların hepsi buzdolabında muhafaza edilmelidir.	4
8. Periyodik olarak, buzdolabının ısısı kontrol edilmelidir.	100
9. Şoklama / Dondurma, gıda içerisindeki tüm bakterileri öldürür.	64
10. Mikrop taşıyan gıdalarda mutlaka; renk, koku, ve tat değişimi olur.	0
11. Deri üzerinde yara oluştuğunda gıda çalışanı yara iyileşene kadar çalışmaya ara vermelidir.	100
12. Gıda çalışanı ishal olmuşsa, hazırladığı gıdalar tüketici sağlığını tehdit edebilir mi ?	88
13. Sağlıklı insanlar da deri, ağız ve burunlarında mikrop taşıyabilirler.	88
14. Gıda kaynaklı hastalıklar hamile kadınlarda düşüklere neden olabilir.	96
15. Çocuk, hamile ve yaşlılar gıda kaynaklı hastalıklara daha kolay yakalanırlar.	100
16. Salata tahtası ve et doğrama tahtası ayrı olmalıdır.	92
17. Gıda zehirlenmesi belirtileri nelerdir biliyor musun ? Örnek verebilir misin ?	92
18. Hangi gıdaların mutlaka buzdolabında saklanması gerekir ?	92
19. 8°C ile 65°C arasındaki mikroorganizmalar gıdada hızla ürerler, sizce bu doğru mudur ?	92
20. Gıdaları (ekmek, poğaç, sandviç, peynir, süt, ayran) buzdolabında muhafaza etmek, gıdanın bayatlamasını geciktirir.	88
21. Çiğ balık, köfte, tavuk gibi çabuk bozulan gıdalar, buzdolabında (diğer gıdalardan ayrı raflarda) 1-2 günden fazla bekletilmeden tüketilmelidir.	100
22. Köfte, et, balık gibi dipfrizde muhafaza edilmesi gereken çiğ gıdalar, dondurma gibi gıdalarla bir arada muhafaza edilebilir.	92
Hangi gıda türü, gıda zehirlenme vakalarında daha risklidir ?	
*Pişmemiş tavuk *Poğaç	
*Pişmemiş köfte. *Peynir	8
*Çorba *Ayran	
*Ekmek *Pasta	

Gıda güvenliği bilgi değerlendirme skoru %72,17.

Tablo 3. Gıda çalışanlarının el hijyen profilleri
Table 3. Hand hygiene profiles of food workers

Mikroorganizma	N	Pozitif örnek sayısı (%)	Hedefi aşan örnek sayısı (%)
<i>Enterobacteriaceae*</i>		19 (82.6)	
Colliforms		17 (73.91)	10 (43.47)≥2.5 cfu/cm ²
<i>E. Coli</i>	23	13 (56.52)	9 (39.13)>1 cfu/ cm ²
<i>S. aureus*</i>		19 (82.6)	

n: Farklı kantin ve kafeteryalardaki toplam el örneği sayısı.

*: Hedef değeri yok

Tablo 4. Erciyes Üniversitesi Kampüsünde, kantin gıda çalışanlarının demografik özellikleri
Table 4. Demographic characteristics of canteen food workers at Erciyes University Campus

GIDA ÇALIŞANI NİTELİKLERİ	SAYI	%
CİNSİYET		
ERKEK	12	48
KADIN	13	52
YAŞ		
17 – 25	2	8
25 – 35	12	48
35 – 45	4	16
45- 55	6	24
>55	1	4
EVLİLİK DURUMU		
BEKAR	6	24
EVLİ	19	76
EĞİTİM		
İLKOKUL	8	32
ORTA OKUL	1	4
LİSE	11	44
ÜNİVERSİTE	5	20
DENEYİM		
0 - 10	21	84
10 - 25	3	12
>25	1	4
POZİSYON		
ÇALIŞAN	23	92
SAHİP	2	8

Tablo 5. Gıda güvenliği bileşenleri
Table 5. Food safety components

GIDA GÜVENLİĞİ BİLEŞENLERİ		SAYI	%
1.	Personelde takı var mı ?	3	12
2.	Çalışanlar eldiven vb kullanmakta mı ?	11	44
3.	Çalışanlar önlük giyiyor mu ?	19	76
4.	Bone takmış mı ?	12	48
5.	Sakal, bıyık var mı ?	6	24
6.	Çalışma ortamında çeşme bulunuyor mu ?	22	88
7.	Elinde, yüzünde yara var mı ?	2	8
8.	Ağız, burun ve ya göz akıntısı var mı ?	0	0
9.	Havalandırma yeterli mi ?	20	80
10.	Kapı ve pencerede sinek, böcek vb. Zararlıların girişini engelleyecek tedbirler yeterli mi ?	0	0
11.	Zemin ve duvar temiz mi ?	20	80
12.	Tüketime hazır gıdalar ile pişirilecek gıdalar bir arada mı muhafaza ediliyor ?	5	20
13.	tüketime hazır gıda satılıyor mu ?	18	72
14.	Çok irrite edici ekstrem bir durum var mı ?	5	20
15.	Tezgahın gerisinde gıda çalışanından hariç birileri var mı ?	3	12

TARTIŞMA

FDA (The Food and Drug Administration)'ya göre, gıda çalışanları yoluyla oluşan gıda kaynaklı hastalık vakalarının sayısı, ciddi önlemler gerektirecek boyuttadır. Gıda çalışanlarının gıdayı kontamine etmesine ilişkin faktörleri ve söz konusu kontaminasyonun önlenmesi veya minimize edilmesine ilişkin önlemlerin etkinliğini araştıran FDA, üç önemli başlığa işaret etmektedir; i) hasta gıda çalışanlarının gıda hazırlama alanlarından uzaklaştırılması, ii) gıda çalışanlarının ellerinden patojenlerin uzaklaştırılması, iii) el gıda temasının kesilmesine yönelik bariyerlerin kullanılması (FDA 1999).

Bu çalışma çerçevesinde Erciyes Üniversitesi kampüsünde bulunan kantinlerde gıda çalışanlarının gıda hijyen bilgilerinin değerlendirilmesine yönelik yapılan ankette ortalama doğru cevap skoru %72,17 olarak belirlenmekle birlikte, çalışanlar arasında genel olarak mikroorganizmaların üreme ve muhafaza sıcaklıkları, gıda çalışanlarının gıdayı kontamine etme potansiyelleri ve riskli gıdalara dair bilgi eksikliği tespit

edilmiştir. Benzer şekilde Romanya'da küçük ve orta ölçekli işletmelerde gıda çalışanlarına yapılan anket

sonuçlarındaki doğru cevap skoru %63,2 olarak belirlenmiştir (Jianu ve ark. 2012). Aynı çalışmada genel hijyen bilgisinin eğitim seviyesiyle direkt olarak ilişkili bulunduğu, elde edilen yanlış cevapların genellikle mikrobiyel riskler, çapraz kontaminasyon ve sıcaklık kontrolleriyle ilgili konularda yoğunlaştığı bildirilmektedir.

Yine Abdul-Mubtalip ve ark. (2012) tarafından Malezya'da yapılan bir çalışmada, restoranda çalışan 64 gıda personelinin gıda hijyenine yönelik bilgi, tutum ve uygulamalarının çok iyi düzeyde olduğu belirlenmiş ve çalışanların eğitim seviyesi ile elde edilen bu yüksek skorlar arasında pozitif ilişki olduğu vurgulanmıştır. Bunun yanı sıra araştırmacılar yüksek skorlara rağmen; gıdaların soğuk muhafazası, temiz çalışma alanlarında gıda hazırlanması ve takı kullanımı konusunda yeterli özen ve tutum sergilenmediğini rapor etmişlerdir. Neticede çalışanların kendi spesifik alanlarında sürekli eğitim almaları ve eğitim konularının ise özellikle eksik oldukları konularda

yoğunlaşması gerektiği, aksi halde eğitim çalışmalarının zaman kaybından ibaret olduğu belirtilmektedir (Abdul-Mubtalip ve ark. 2012).

Güney Batı Londra bölgesinde gıda hijyeni eğitim etkinliğinin, gıda çalışanlarının tutum ve davranışına yönelik herhangi bir değişiklik yapıp yapmadığını değerlendiren bir çalışmada elde edilen sonuçlar çoğu gıda endüstrisi yöneticisinin gıda çalışanlarının eğitimine yönelik sorumluluklarının farkında olduklarını bununla birlikte etkin bir eğitim uygulamasına yeterli destek sağlamadıkları belirlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışma sonucunda gıda hijyen eğitim programlarının olumlu sonuçları geçici ve kısa ömürlü olarak değerlendirilmektedir (Seaman 2010). Aynı araştırmacılar gıda hijyen eğitim programlarının sürekli ve etkili olabilmesi için gıda endüstrisi yöneticilerinin yaklaşımlarının kritik rol oynadığını vurgulamışlardır (Seaman 2010). Özellikle küçük ölçekli işletmelerde genellikle işletme sahibinin aynı zamanda işletme çalışanı olduğu durumlarda zaman ve bilgi eksikliğinden kaynaklanan eğitim aksaklıkları gündeme gelmekte ve mevzuatta belirtilen derinlikte bir eğitim süreci gerçekleştirilmemektedir (Mortlock ve ark. 2000). Slovenya'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada 386 gıda çalışanı için bir anket düzenlenmiş ve çalışanların çoğunda mikrobiyal tehlikeler konusunda önemli eksiklikler belirlenmiştir. Çalışanların anketlerinden yapılan analiz göstermiştir ki çalışanların işlerine yönelik tatmin duyguları gıda hijyen tutum ve davranışlarını önemli düzeyde etkilemektedir. Çalışmada ayrıca insan kaynakları yönetiminin HACCP sistemi içerisine dahil edilmesi gerektiği de belirtilmektedir. Aynı araştırmacılar gıda kaynaklı hastalıkların önlenmesi ve etkili güvenlik önlemlerinin alınabilmesi için HACCP ve gıda hijyeni prensiplerine yönelik sıkı önlemlerin alınması gerektiğini, bunun için de gıda hazırlama alanlarının hijyenik açıdan gerekli alt yapıyı sağlamış olmasının ve motivasyonu yüksek kalifiye elemanlar çalıştırmanın gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

HACCP sistemi multidisipliner bir yaklaşımla takip edilmesi gereken, hem yönetici hem de çalışanlar için düşünme, organizasyon, yönetim, eğitim ve süreklilik isteyen bir yaklaşımdır (Jevsnik ve ark. 2008). Bu yaklaşımın etkili bir hale gelebilmesi için; çalışanlar tarafından anlaşılması ve işverenler tarafından da gerekenlerin yapılması, tüm ayrıntıların yerine getirilmesi, bunların gereksiz bir yük değil, iş döngüsünün sürekli geliştirilebilmesi için bir istek kaynağı olması gerektiği, dolayısıyla eğitimin sadece çalışanlarla sınırlı kalmaması yöneticileri de kapsamaya gerektiği vurgulanmaktadır (Jevsnik et al. 2008). Yapılan bir çalışmada, gıda çalışanlarına, işletme uzmanları veya denetimciler tarafından verilen eğitimin çok daha etkili sonuçlar doğurduğu ortaya konmaktadır (Mortlock ve ark. 2000).

Jevsnik ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada çalışanların gıda hijyenin konusunda aldıkları düşük skorlar; iyi iş çıkaran çalışanın ödüllendirilmemesi, herhangi bir ekstra ücret veya promosyon imkanının sağlanmaması ve çalışma ortamlarının bahsi geçen gıda hijyeni uygulamaları için uygun olamaması olarak sıralanmaktadır. Tüm bu unsurlar çalışanların motivasyonunu ve işyeri tatmin duygusunu zayıflatmakta ve işi layığı ile yapma duygusunu baltalamaktadır. Gıda güvenliği gereklilikleri işyeri sahibi için mevzuatta belirtilen sistem gereklilikleri ile çalışan personelin uygulamaları arasındaki dengeyi sağlamaktan geçmektedir (Jevsnik ve ark. 2008). İşyeri tatmin duygusunun gıda güvenliğine ve uygulamaya yönelik unsurlarda önemli düzeyde etkili olduğu belirtilmektedir (Ko 2010).

Herhangi bir gıdada veya yüzeyde total koliform ve *E. coli* sayıları, hijyenle ilişkili problemlerin ve fekal orijinli kontaminasyonların belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Yüksek total koliform ve *E.coli* sayıları önemli düzeyde enterik patojen varlığına bağlı olarak şekillenmektedir (Barros ve ark. 2007). Patojenlerden *S. aureus* ise genel olarak insanların burun mukoza ile el ve yüz yaralarında bulunmakta ve sıklıkla personel yoluyla gıdalara bulaşmaktadır. Bu çalışma bulgularına göre, çalışanların ellerinin %73,91'inde koliform grubu belirlenirken, bunlardan %40,47'sinin literatürlerde belirlenen hedef değerlerin (<2,5 kob/cm²) üzerinde olduğu belirlenmiştir (Lues ve Van Tonder 2007). *E. coli*, Enterobacteriaceae ve *S. aureus* ise örneklerin sırasıyla %56,52, %82,6 ve %82,6 'sında belirlenmiştir. Öte yandan Lues ve Tonder (2010), tarafından Güney Afrika'da yürütülen bir çalışmada açıkta gıda satışında görevli çalışanlara ait el örneklerinin %32'sinde 2,5 kob/cm²'den fazla koliform tespit edilmiştir.

Çalışanların sadece birinin elinde *E.coli*, %16'sında Enterobacteriaceae, %88'inde ise *S.aureus* tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışma sonucunda tüketime hazır gıdaların yüksek risk arzettiği, gıda işletmelerindeki temas yüzeylerinin de gıda güvenliği açısından kritik öneme sahip olduğu ve çapraz kontaminasyona ilişkin gereken önlemlerin alınması tavsiye edilmektedir. Dolayısıyla gıda çalışanlarının eğitimine yönelik vurgu yapılmıştır.

El hijyeni mikroorganizmaların taşınmasını önleyebilecek en etkin uygulamadır. Bununla birlikte sadece el hijyenini ön sıraya koyarak enfeksiyonların azalmasının beklemenin tek başına yeterli olamayacağı, enfeksiyon kontrolünde çevre hijyeni, personel hijyeni ve çalışanların eğitim düzeylerinin de etkili birer faktör olduğu vurgulanmakta dolayısıyla enfeksiyon kontrolüne ilişkin entegre bir yaklaşım sergilenmesi gerektiği belirtilmektedir (Juuma 2005). Özellikle gelişmekte olan ülkelerde el yıkama alışkanlıklarının artırılmasına ilişkin engeller daha fazladır. Örneğin basit sanitasyon altyapı imkanları

bile sınırlı veya bulunmuyor olabilir. Dolayısıyla el yıkama alışkanlıklarının artırma yönündeki çalışmalar gelişmekte olan ülkeler ile gelişmiş olan ülkeler arasında farklı bir yaklaşım gerektirmektedir. Muhtemelen bu sebepten dolayı el hijyenini artırmaya yönelik birçok halk sağlığı kampanyası büyük oranda başarısızlıkla sonuçlanmıştır (Juuma 2005).

Bu çalışma sonunda, kantinlerde satışa sunulan gıdaların, personel ellerinin ve gıda temas yüzeylerinin indikatör ve bazı patojen bakterilerle kontamine olduğu belirlenmiştir. Çiğ ve tüketime hazır besinlerin hazırlanması esnasında çalışanların ellerindeki ve gıda temas yüzeylerindeki kontaminantların son ürüne taşınmasının önlenmesi halk sağlığının korunmasında önem arz etmektedir. Hijyen kurallarının; kantinlerde, önemini kavrayacak iyi eğitilmiş bir personel olmadan, fonksiyonel bir gıda güvenlik sisteminin uygulanması ve sürdürülmesi, gerçekleştirilmesi çok zor bir hedefdir. Zira el hijyenine uyumun temelde insan davranışı ile alakalı olduğu ve bu davranışların temel nedenleri ve nasıl desteklenebileceği gibi konuların şimdiye kadar ciddi ve kalıcı bir çözüm üretilmediği belirtilmektedir (Gomes-Neves ve ark. 2011).

El hijyeni uygulamaları sadece gıda personeline yönelik bir uygulama ile değil toplumun bütün düzeylerine hitap eden yapısal bir sosyal, kültürel değişiklik gerektirmektedir. El hijyen uygulamalarına ilişkin global tavsiyeler yeterli olmayabilir. Coğrafik ve kültürel faktörler göz önüne alınarak gerekli uygulamalar işleme konulmalıdır. Öte yandan el hijyeni bilinci abartılarak hijyen hastalığı haline de getirilmemelidir. Bu çerçevede belli bir işletmede el hijyeni uygulamaları bulaşan mikroorganizmanın öldürülmesinden ziyade mikroorganizmaların taşınmasının ve yayılmasının önlenmesine odaklanmalıdır.

SONUÇ

El hijyeni uygunlukları dünya genelinde maalesef istenen seviyede değildir. Her ne kadar el hijyeni basitmiş gibi görünse de el hijyeni alışkanlıklarını belirleyen faktörler oldukça farklıdır. Dolayısıyla el hijyeni alışkanlıklarını düzeltmek için öncelikle insanlardaki alışkanlıkları düzenleyen faktörleri ortaya koymak gerekmektedir. El hijyeni uygulamalarının düzeltilmesi genellikle kültürel ve sosyal gereksinimlerin karşılanması ile de yakından alakalı olmakla birlikte uygun el yıkama uygulamaları ulusal düzeyde halk sağlığı kampanyalarıyla yeni stratejiler geliştirilerek yaygınlaştırılmalıdır.

Sonuç olarak bu çalışmada çalışanların gıda güvenliği bilgi değerlendirme sonuçları yüksek skorlar ortaya koymuş olmasına karşın, el örneklerindeki patojen kontaminasyon yüzdeleri yüksek bulunmuştur. Gıda çalışanlarına yönelik mevcut eğitim modelinin revize edilerek etkin bir şekilde uygulanması, hijyen

eğitimlerinin sürekliliğinin sağlanması, eğitim etkinliğinin denetlenmesi ve gıda satış yerlerinde katı ve sürekli kontrollerin uygulanması gerekmektedir.

Gıda işletmelerinde gıda hazırlama aktivitelerinin iyi bir şekilde organize edilerek gıda personelinin iş yükü, en az el yıkama sıklığını gerektirecek şekilde düzenlenmeli, işletmelerde el yıkamaya ilişkin gerekli temel ihtiyaçların da mutlaka sağlanması gerekmektedir. Bu çalışma sonunda, kantinlerde satışa sunulan gıdaların, personel ellerinin ve gıda temas yüzeylerinin indikatör ve bazı patojen bakterilerle kontamine olduğu belirlenmiştir. Çiğ ve tüketime hazır besinlerin hazırlanması esnasında, çalışanların ellerindeki ve gıda temas yüzeylerindeki kontaminantların son ürüne taşınmasının önlenmesi halk sağlığının korunmasında önem arz etmektedir. Kantinlerde hijyen uygulamalarının önemini kavrayacak iyi eğitilmiş bir personel olmadan, fonksiyonel bir gıda güvenlik sisteminin uygulanması ve sürdürülmesi çok zor bir hedef olarak görülmektedir.

TEŞEKKÜR

- *Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Besin Hijyeni ve Teknolojisi Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2017, Kayseri.*
- *7. Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Aydın 4-8 Ekim 2017.*
- *Erciyes Üniversitesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu 25.01.2016 tarih 96681246/04 sayılı karar*

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdul Mutalib NA, Abdul Rashid MF, Mustafa S, Amin-Nordin S, Hamat RA, Osman M.** Knowledge, attitude and practises regarding food hygiene and sanitation of food handlers in Kuala Pilah, Malaysia. *Food Control.* 2012; 27: 289-293.
- Angelillo IF, Viggiani NMA, Rizzo L, Bianco A.** Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes, and reported behavior in Italy. *J. Food Prot.* 2000; 63(3):381-385.
- Barros MAF, Nero LA, Monteiro AA, Beloti V.** Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Food Sci. Technol.* 2007; 27(4): 856-862.
- Bas M, Ersun AS, Kıvanç G.** The evaluation of food hygiene knowledge, attitudes, and practices of food handlers' in food businesses in Turkey. *Food Control.* 2006; 17(4):317-322.
- Blood RM, Curtis GDW.** Media for 'total' enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* 1995; 26(1):93-115.
- Bolton DJ, Meally A, Blair IS, McDowell DA, Cowan C.** Food safety knowledge of head chefs and catering managers in Ireland. *Food Control.* 2008; 19(3):291-300.

- Burch NL, Sawyer CA.** Food handling in convenience stores: the impact of personnel knowledge on facility sanitation. *J. Environ. Health.* 1991; 54(3):23-27.
- Cogan TA, Slader J, BloomWeld SF, Humphrey TJ.** Achieving hygiene in the domestic kitchen: The effectiveness of commonly used cleaning procedures. *J. Appl. Microbiol.* 2002; 92:885-892.
- Collins JE.** Impact of changing consumer lifestyles on the emergence/re-emergence of foodborne pathogens. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 3(4):1-13.
- Çakıroğlu FP, Uçar A.** Employees' perception of hygiene in the catering industry in Ankara, Turkey. *Food Control.* 2008; 19(1):9-15.
- De Boer E.** Update on media for isolation of enterobacteriaceae from foods. *Int. J. Food Microbiol.* 1998; 45(1):43-53.
- Domínguez C, Gómez I, Zumalacárregui J.** Prevalence of Salmonella and Campylobacter in retail chicken meat in Spain. *Int. J. Food Microbiol.* 2002; 72:165-168.
- European Food Safety Authority (EFSA).** The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal.* 2010; 8(1):1410-1496.
- FDA (U.S. Food and Drug Administration).** Evaluation of risks related to microbiological contamination of ready-to-eat food by food preparation workers and the effectiveness of interventions to minimize those risks. Food and Drug Administration center for food safety and applied nutrition. 1999 USA.
- Gomes-Neves E, Cardoso CS, Araújo AC, Correia da Costa JM.** Meat handlers training in Portugal: a survey on knowledge and practice. *Food Control.* 2011; 22(3-4):501-507.
- Jevnik M, Hlebec V, Raspor P.** Food safety knowledge and practices among food handlers in Slovenia. *Food Control.* 2008; 19(12):1107-1118.
- Jianu C, Chiş C.** Study on the hygiene knowledge of food handlers working in small and medium-sized companies in western Romania. *Food Control.* 2012; 26:151-156.
- Juuma PA.** Hand hygiene: simple and complex. *IJID.* 2005; 9:3-14.
- Ko, WH.** Evaluating food safety perceptions and practices for agricultural food handler. *Food Control.* 2010; 21:450-455.
- Legnani P, Leoni E, Berveglieri M, Mirolo G, Alvaro N.** Hygienic control of mass catering establishments, microbiological monitoring of food and equipment. *Food control.* 2004; 15(3), 205-211.
- Lues JFR, Van Tonder I.** The occurrence of indicator bacteria on hands and aprons of food handlers in the delicatessen sections of a retail Group. *Food Control.* 2007; 18:326-332.
- Moore G, Griffith C.** A comparison of traditional and recently developed methods for monitoring surface hygiene within the food industry: an industry trial. *International journal of environmental health research.* 2002; 317-329.
- Mortlock MP, Peters AC, Griffith CJ.** A national survey of food hygiene training and qualification levels in the UK food industry. *Int J Environ Health Res.* 2000; 10(2):111-123.
- Rennie DM.** Evaluation of food hygiene education. *British Food Journal.* 1994; 96(11): 20-25.
- Rippel B.** Consumer knowledge about food safety revealed. Washington, DC. Consumer Alert. 2002.
- Seaman P.** Food hygiene training: introducing the food hygiene training model. *Food Control.* 2010; 21(4):381-387.
- Taylor JH, Brown KL, Toivenen J, Holah JT.** A microbiological evaluation of warm air hand drier with respect to hand hygiene and the wash room environment. *J. Appl. Microbiol.* 2000; 89: 910-919.
- Tokuç B, Ekuklu G, Berberoglu U, Bilge E, Dedeler H.** Knowledge, attitudes and self-reported practice of food service staff regarding food hygiene in Edirne, Turkey. *Food Control.* 2009; 20(6):565-568.
- Travis HR.** Training for seasonal food service operation. *J. Environ. Health.* 1986; 48:265-267.
- Walker E, Pritchard C, Forsythe S.** Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control.* 2003; 14(5):339-343.
- Yapp C, Fairman R.** Factors affecting food safety compliance with in small and medium-sized enterprises: implications for regulatory and enforcement strategies. *Food Control.* 2006; 17(1):42-51.

The Effect of Temperature on Angiogenesis in Chicken Embryos

Emre ATAY^{1*}, Seval AYEKİN², Rabia Zülal HATİPOĞLU², Münevver Ceyda KURAL², Mert KUSEYRİ², Yavuz TAÇYILDIZ², Yusuf BAŞOĞLU², Ali Batuhan ALKAN², Abdülkadir BİLİR¹, Tolga ERTEKİN¹

¹Afyonkarahisar Health Sciences University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy, 03030, Afyonkarahisar, Turkey

²Afyonkarahisar Health Sciences University, Faculty of Medicine, 03030, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

Angiogenesis plays an important role in the formation of new vessels in the embryonic period. The aim of this study is to determine possible differences in angiogenesis process in chicken embryos exposed to two different incubation temperatures of 37.5°C and 39.0°C using Chorioallantoic Membrane (CAM) model. The study included two groups, each with an experimental and control group, in which 16 fertilized chicken eggs were analyzed. The eggs were opened on the 7th day of incubation with the aid of forceps and surgical scissors without damaging the embryo. Head-stern, occipito-frontal length, vessel thickness, density and number of each embryo on CAM were measured by ImageJ. Statistical analysis of the data was performed by SPSS program. Depending on the temperature, there was a decrease, although not statistically significant, in the values of head-stern lengths of the embryos obtained from the eggs incubated at 39.0°C. However, it was determined that occipito-frontal length values increased, the skull had a larger appearance and this increase was statistically significant ($p<0.05$). The mean density of embryos obtained from eggs incubated at 37.5°C was 1.58 ± 0.57 , while the mean vessel density of embryos obtained from eggs incubated at 39.0°C was 1.46 ± 0.61 . There was no statistically difference between mean vessel density values ($p>0.05$). A comparison of both groups showed a decrease in the number of vascular branches (35.44 ± 10.97 at 37.5°C, 24.94 ± 6.97 at 39.0°C) due to the increasing temperature. This decrease was found to be statistically significant ($p<0.05$). In general, it was observed that the increase in temperature caused a decrease in vessel density, thickness and number of branches in chicken embryos on CAM. As a result, it was determined that growth and development were negatively affected in embryos.

Keywords: Angiogenesis, chick, chorioallantoic membrane, temperature, vessel

Tavuk Embriyolarında Sıcaklığın Anjiyogenez Üzerine Etkisi

ÖZ

Anjiyogenez embriyonik dönemde yeni damarların oluşumunda önemli bir rol oynar. Bu çalışmanın amacı, Koryoallantoik Membran (KAM) modeli kullanılarak 37.5°C ve 39.0°C olacak şekilde iki farklı kuluçka sıcaklığına maruz bırakılan tavuk embriyolarında anjiyogenez sürecindeki olası farklılıkları belirlemektir. Çalışmada her birinde 16'şar adet dömlü tavuk yumurtasının analiz edildiği deney ve kontrol grubu olmak üzere iki grup yer aldı. Yumurtalar inkübasyonun 7. gününde penset ve cerrahi makas yardımıyla embriyoya zarar vermeden açıldı. Fotoğrafları çekilen embriyoların tepe-kıç ve occipito-frontal uzunlukları ile KAM'daki damar kalınlıkları, damar yoğunluğu ve damar dal sayıları ImageJ programı kullanılarak ölçüldü. Verilerin istatistiksel analizi SPSS programı aracılığıyla yapıldı. Sıcaklığa bağlı olarak 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların tepe-kıç uzunluklarının değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir azalma mevcuttu. Bununla birlikte occipito-frontal uzunluk değerlerinin arttığı, kafatasının daha büyük bir görünüme sahip olduğu ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). 37.5°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların damar yoğunluğu ortalaması 1.58 ± 0.57 iken, 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ortalama damar yoğunluğu 1.46 ± 0.61 olarak tespit edildi. Ortalama damar yoğunluğu değerleri arasında istatistiksel olarak gruplar arasında bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Her iki grubun karşılaştırılmasında artan sıcaklığa bağlı olarak damar dal sayısında bir azalma (37.50C'de 35.44 ± 10.97 , 39.00C'de 24.94 ± 6.97) olduğu görüldü. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Genel anlamda sıcaklık artışının tavuk embriyolarında KAM'da damar yoğunluğu, kalınlığı ve dal sayısında bir azalmaya sebep olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak embriyolarda büyüme ve gelişmenin olumsuz yönde etkilendiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Anjiyogenez, civciv, damar, koryoallantoik membran, sıcaklık

To cite this article: Atay E, Ayekin S, Hatipoğlu R.Z, Kural M.C, Kuseyri M, Taçyıldız Y, Başoğlu Y, Alkan A.B, Bilir A, Ertekin T. The Effect of Temperature on Angiogenesis in Chicken Embryos. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):60-68

Submission: 10.12.2019 Accepted: 12.02.2020 Published Online: 18.02.2020

ORCID ID; EA: 0000-0002-2378-1183, SA: 0000-0001-9768-7336, RZH: 0000-0002-5640-566X, MCK: 0000-0001-7675-4448, MK: 0000-0002-8999-6312, YT: 0000-0003-1020-0973, YB: 0000-0002-4380-4565, ABA: 0000-0001-9130-3979, AB: 0000-0003-0633-9542, TE: 0000-0003-1756-4366

*Corresponding author e-mail: cemreatay@gmail.com

GİRİŞ

Fizyolojik bir süreç olan anjiyogenez, mevcut kan damarlarından tomurcuklanma yolu ile yeni kan damarlarının oluşması ve gelişmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Hagedorn ve Nerlich 2000, Kumar ve ark. 2005, Strohmeyer ve ark. 2000). Anjiyogenez hem embriyonik dönemde hem de yetişkinlik döneminde rol oynayan önemli bir süreçtir. Embriyonik dönemde anjiyogenez sürecinde damar yoğunluğunun artması ve yeni damarların oluşumu görülmektedir. Yetişkinlik döneminde ise anjiyogenez süreci bazı fizyolojik (menstrüasyon, ovulasyon, gebelik, yara iyileşmesi ve epitelizasyonu gibi) ve patolojik olaylar neticesinde (diyabetik retinopati, tümör gelişimi, metabolik hastalıklar, inflamasyon ve dejenerasyon gibi) yeni damarların oluşumunda rol oynamaktadır (Bettencourt ve ark. 1998, Costa ve ark. 2004, Folkman 1986, Logan 1993, Nicholson ve Theodorescu 2004, Saraydaroglu ve ark. 2004). İyileşmeyi etkileyen önemli faktörlerden biri yaralanan dokunun beslenmesi ve yeterli kan akımının sağlanmasıdır. Günümüzde anjiyogenez ile ilgili artan bilgi birikimi, birçok hastalığın oluşum mekanizmasının anlaşılmasına ve tedavi sürecinde yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına olanak sağlamaktadır (Townsend ve ark. 2004). Bu bağlamda anjiyogenez çalışmaları günümüzde aktif bir araştırma alanı olup, gelecek dönemlerde antianjiyojenik/proanjiyojenik tedavi yöntemlerine başvuracak insan sayısının 500 milyonun üzerinde olacağı düşünülmektedir (Norrby 2006).

Canlıların büyüme gelişme dönemi için sıcaklık önemli faktörlerden biridir. Son yıllarda gebeler üzerinde yapılan çalışmalarda ortam sıcaklığının erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve ölü doğumlara neden olduğu bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda ise yüksek ortam sıcaklığı ve aşırı sıcaklık olaylarının preterm doğum ile ilişkili olduğu ve erken doğumu tetikleyebileceği ifade edilmiştir (Auger ve ark. 2014, Basu ve ark. 2010, Basu ve ark. 2017, Ha ve ark. 2017a, Ha ve ark. 2017b, Strand 2012, Zhang ve ark. 2017). Bu bilgiler ışığında çalışmamız sıcaklığın anjiyogenez üzerindeki etkisinin ortaya konulmasına yönelik planlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda tavuk embriyolarından elde edilen sonuçların memelilere de uyarlanabildiği görülmüş ve döller tavuk ya da bildircin yumurtalarının model olarak kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır (Ertekin ve ark. 2019, Guvenc ve ark. 2013, Guvenc ve ark. 2016, Mangır ve ark. 2018, Ribatti 2016, Zhang ve ark. 2017). Bu tip çalışmaların insanlar ve memeli hayvanlar üzerinde yapılması her zaman mümkün olmadığından döller kanatlı yumurtaları sıklıkla tercih edilmektedir. Bu tür modellerin tercih edilmesinin bir başka sebebi ise insan ve memeli hayvanların fizyolojik ve patolojik durumlardaki işlevlerinin bütünsellik göstermesi, çeşitli organ ve

sistemlerin etkileşim halinde bulunmasıdır (Oral ve Çakar 2005).

Çalışmamızda embriyonik süreçteki anjiyogenezin farklı inkübasyon sıcaklığına göre değişimi Koryoallantoik Membran (KAM) modeli kullanılarak tespit edildi. KAM modeli kolay, basit ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasıyla birçok çalışmada (kanser araştırmaları, damar gelişimi, embriyolojik malformasyonlar vs.) tercih edilmektedir (Dupertius ve ark. 2015, Leng ve ark. 2004, Özgürtaş 2009, Peng ve ark. 2009, Ribatti 2014). KAM modelinde anjiyogenez gelişimsel aşamalarına göre; erken faz (5.-7. günler), ara faz (8.-12. günler) ve geç faz (13. günden itibaren) olmak üzere üç safhadan oluşmaktadır (Schlatter et al. 1997). Kapiller ağ erken fazda filizlenmeye başlamaktadır. Ara faz filizlenmenin sona erdiği ve mikrovasküler ağın gelişim gösterdiği aşamadır. Geç fazda ise, koryoallantoik ögeler embriyo etrafında tam koruyucu bir membrana dönüşür ve genişlemesi tamamlanmaktadır (Hamburger ve Hamilton 1992). KAM modeli kullanılarak yapılan çalışmalarda anjiyogenez gelişim fazları göz önüne alınarak uygulamaların 5. günden itibaren yapılabileceği ifade edilmektedir (Hazel 2003). Bunun yanı sıra damarlanmanın olgunlaştığı 12. günden sonraki geç faz döneminin uygulamalar açısından daha iyi bir zamanlama olduğu da ifade edilmektedir (Leng ve ark. 2004). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamız, kapiller ağ ve damarlanmanın başladığı erken faz dönemi dikkate alınarak planlanmıştır. Çalışmamızın amacı, KAM modeli kullanılarak iki farklı kuluçka sıcaklığına maruz bırakılan tavuk embriyolarında anjiyogenez sürecinde meydana gelen olası farklılıkları belirlemektir.

MATERYAL ve METOT

Çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu (AKUHADYEK)'nden 14/01/2019 tarihli ve 49533702/08 sayılı etik kurul onayı alındı. Sıcaklığın tavuk embriyoları üzerindeki etkisini incelemek üzere planlanan çalışmamızda 60 adet, 0 günlük, 65±5 gr ağırlığında Specific Pathogen Free (SPF) döller tavuk yumurtası kullanıldı. SPF yumurtalar İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi.

Çalışma kapsamında deney ve kontrol olmak üzere iki grup oluşturuldu. Her grupta 30 adet döller SPF yumurta kullanıldı. Kontrol grubundaki döller SPF yumurtalar 37.5°C'de %60±5 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda 7 gün boyunca inkübe edildi. Deney grubundaki döller SPF yumurtalar ise ilk 5 gün 37.5°C'de %60±5 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda, sonraki 2 gün ise 39.0°C'de %60±5 rölatif nemli ortamda horizontal pozisyonda toplam 7 gün boyunca inkübe edildi. Her iki gruptaki

yumurtalar eş zamanlı olarak ayrı makinalarda inkübe edildi (Resim 1).

7. günün sonunda her gruptaki yumurtaların döllü olup olmadığı ışık kaynağı aracılığıyla belirlendi. Dölsüz ve bireysel hatalar neticesinde (embriyoya yumurtayı açarken zarar verme, yumurtanın kırılması vs.) kaybedilen yumurtalar çalışma dışında tutuldu. Her iki grupta ayrı ayrı toplam 16 adet döllü SPF yumurtada analiz yapıldı.

Yumurtalarda ışık kaynağı altında embriyoların yeri belirlendi. Transversal olarak açılan yumurtalar petri kabına döküldü. 25 cm uzaklıktan tripod yardımıyla sabitlenen kamera aracılığıyla fotoğraflandı. Bu işlemden sonra embriyolar, damarlarından penset ve makas yardımıyla ayrıldı. Her embriyo ayrı bir petri kabında tepe-kıç ile occipito-frontal uzunluğu belirlemek üzere tekrar fotoğraflandı (Resim 2). Fotoğraflama işlemi bittikten sonra embriyoların ağırlıkları hassas terazi yardımıyla ölçüldü (Resim 3).

KAM'daki damar kalınlığı, damar yoğunluğu ve damar sayısı ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) programı kullanılarak hesaplandı. Damar yoğunluğu ve damar dal sayısı KAM'da embriyoya en yakın ana damarlarından 0.5 cm uzaklıkta 1 cm²'lik rastgele seçilen 3 alanda belirlenirken, damar kalınlığı için görüntü üzerindeki en kalın 3 damar belirlenerek ortalama kalınlık hesaplandı (Resim 4).

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 22.0 paket programı aracılığıyla yapıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile belirlendi. Veriler normal dağılım göstermediği için bağımsız grupların karşılaştırılmasında kullanılan ve nonparametrik bir test olan Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Tüm değerler ortalama \pm standart sapma ($m \pm ss$) şeklinde ifade edildi.

BULGULAR

Ölçülen parametrelerinin ortalama değerleri ve istatistiksel analizi Tablo 1'de gösterildi. 37.5°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ortalama tepe-kıç uzunluğu 18.08 ± 1.72 mm iken, aynı parametrenin 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan

elde edilen embriyolarda 17.00 ± 2.41 mm olduğu belirlendi. Sıcaklığın arttırılmasına bağlı olarak ortalama tepe-kıç uzunluğunun azaldığının görülmeye rağmen, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi ($p > 0.05$). Occipito-frontal uzunluğa ait ortalama değerlere bakıldığında; 37.5°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ortalama değerinin (6.73 ± 1.08 mm), 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ortalama değerinden (8.06 ± 1.11 mm) daha düşük olduğu görüldü. Bu farkın ise istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Tepe-kıç ve occipito-frontal uzunluğa ait yapılan ölçümlerin genel değerlendirilmesinde, sıcaklığa bağlı olarak 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyolarının boy uzunluğunda bir azalma mevcutken, occipito-frontal mesafenin arttığı ve kafatasının daha büyük bir görünüme sahip olduğu tespit edildi.

Her iki sıcaklığa maruz kalan embriyoların ağırlıkları ölçülmüş ve 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ağırlığının (0.42 ± 0.11 gr) 37.5°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyolardan (0.54 ± 0.12 gr) daha az olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda ağırlık açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0.05$).

37.5°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyolara ait KAM'daki damar yoğunluğu ortalaması $\%1.58 \pm 0.57$, 39.0°C'de inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların damar yoğunluğu ortalaması ise $\%1.46 \pm 0.61$ olarak hesaplanırken gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Damar kalınlığı ele alındığında yüksek sıcaklıkta inkübe edilen yumurtalardan elde edilen embriyoların ortalama değerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğu görüldü. Damar kalınlıkları arasındaki bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$, Tablo 1). Damar dal sayısında kontrol grubuna göre bir azalma olduğu görüldü. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$, Tablo 1).

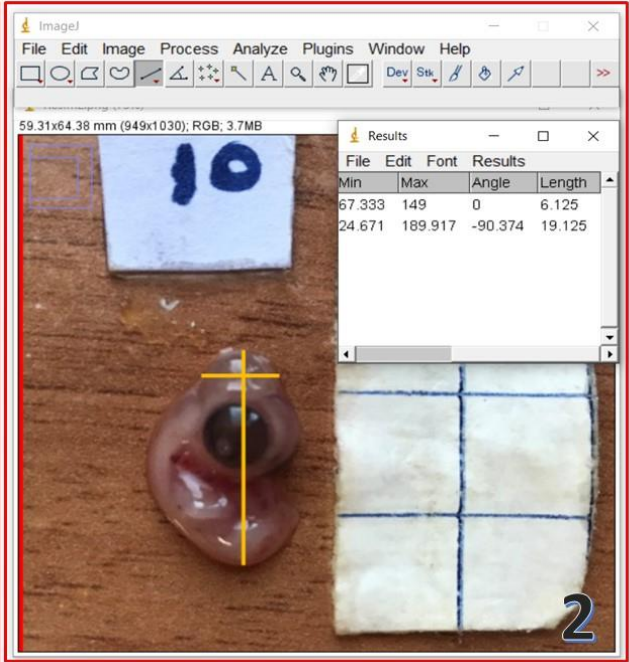
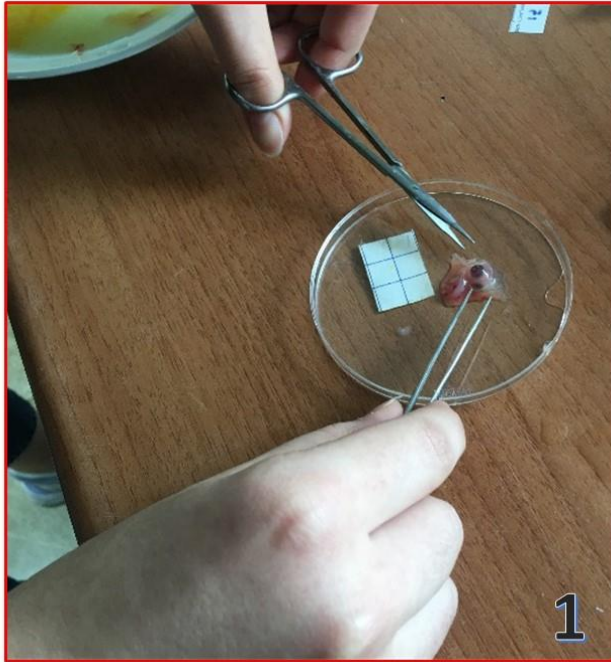
KONTROL GRUBU

DENEY GRUBU



Resim 1. Fertilize Specific Pathogen Free (SPF) yumurtaların inkübasyon cihazına yerleştirilmesi. (1) Kontrol Grubu, (2) Deneysel Grubu

Figure 1. Fertilized Specific Pathogen Free (SPF) eggs in the incubator. (1) Control Group, (2) Experimental Group

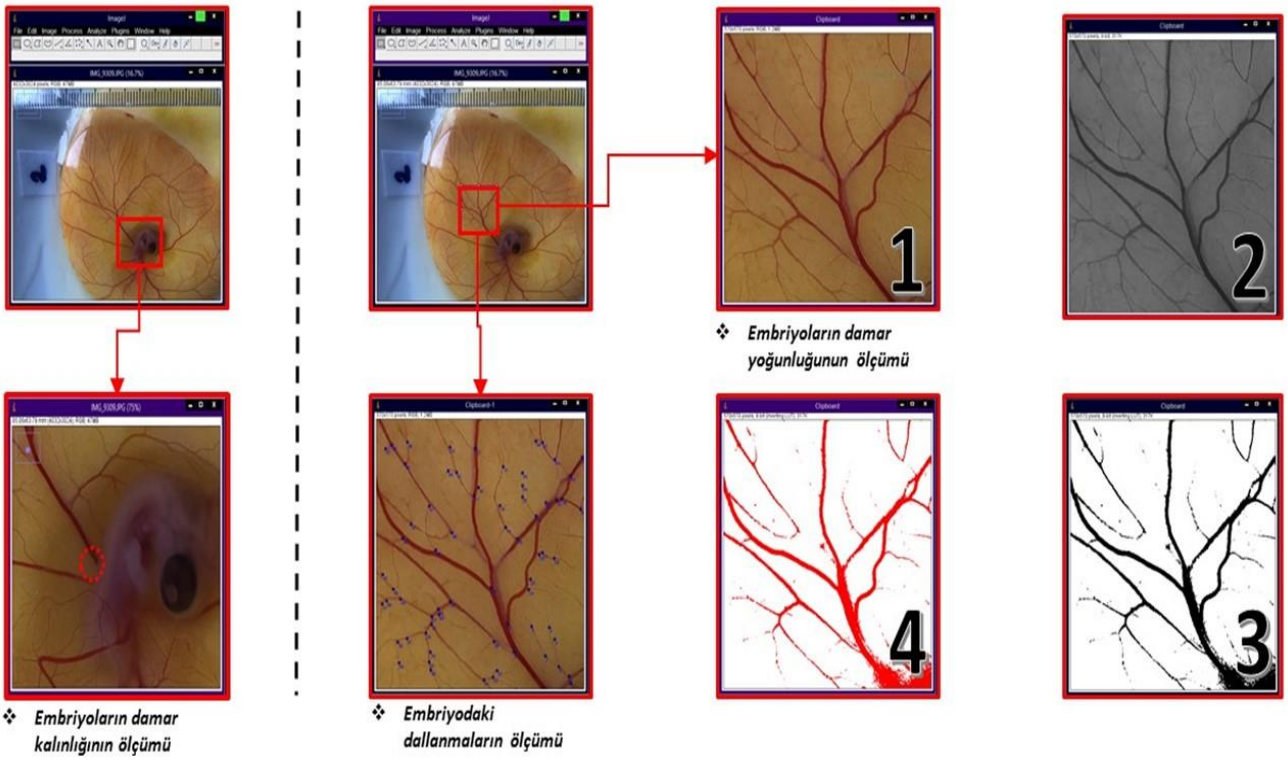


Resim 2. Embriyoların petri kabına alınması. (1) Embriyoların damarlarından ayrılması, (2) ImageJ programı ile tepe-kıç ve occipito-frontal uzunluk ölçümü

Figure 2. Embryos are taken into the petri dish. (1) Separation of embryos from vessels, (2) Head-stern and occipito-frontal length measurement with ImageJ program



Resim 3. Embriyoların ağırlık ölçümü
Figure 3. Weight measurement of embryos



Resim 4. ImageJ programı ile yapılan analiz basamakları. (1) Damar görüntüsünün büyütülmesi, (2) Görüntünün arka planının temizlenmesi, (3) Damarların belirginleştirilmesi, (4) Renkli görüntüde damar yoğunluğunun hesaplanması

Figure 4. Analysis steps performed with ImageJ program. (1) Enlarging the vessel image, (2) Clearing the background of the image, (3) Clarification of the vessels, (4) Calculating the vessel density in color image

Tablo 1. Ölçüm parametrelerine ait ortalama değerler
Table 1. Mean values of the measurement parameters

Ölçüm Parametreleri	37.5°C			39.0°C			p
	n	Min-Max	m±ss	n	Min-Max	m±ss	
Baş Kıç Uzunluğu (mm)	16	14.30-20.62	18.08±1.72	16	12.33-21.21	17.00±2.41	0.132
Occipito-Frontal Uzunluk (mm)	16	4.96-8.78	6.73±1.08	16	6.41-9.81	8.06±1.11	0.001*
Ağırlık (gr)	16	0.32-0.77	0.54±0.12	16	0.18-0.55	0.42±0.11	0.020*
Damar Yoğunluğu Ortalaması (%)	16	0.78-2.71	1.58±0.57	16	0.47-2.94	1.46±0.61	0.598
Damar Kalınlığı Ortalaması (mm)	16	0.28-0.83	0.48±0.16	16	0.25-0.61	0.37±0.10	0.033*
Dal Sayısı Ortalaması (adet)	16	18.00-56.00	35.44±10.97	16	10.00-38.00	24.94±6.97	0.005*

* Mann Whitney U testi, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı

TARTIŞMA ve SONUÇ

Embriyonik gereksinimlerin karşılanması ve maksimum kuluçka randımanı elde edilmesi için kuluçka koşullarının çok iyi ayarlanması gerekir (Meijerhof 2009). Bu bağlamda sıcaklık, inkübasyon sırasında dikkat edilmesi gereken en önemli faktörlerden biridir. Sıcaklık civciv kalitesini ve kuluçka sonrası performansını etkilemekle birlikte embriyonik büyüme ve gelişmeye de katkı sağlamaktadır (Christensen ve ark. 1999, French 1994, Ricklefs 1987, Lourens ve ark. 2005). İnkübasyon sırasında doğru embriyo sıcaklığının ve inkübatör sıcaklık ayarının korunmasının önemli olduğu kanıtlanmıştır (Lourens ve ark. 2005, Meijerhof 2009). Yapılan çalışmalar, inkübasyonun 19. gününe kadar 37.8°C'lik sabit yumurta kabuğu sıcaklığının en yüksek kuluçka randımanı ve en düşük embriyo mortalitesi ile sonuçlandığını göstermiştir (Lourens ve ark. 2005, Lourens ve ark. 2007). Leksrisompong ve ark. (2007) 39.5°C ve daha yüksek bir yumurta kabuğu sıcaklığının embriyonun kalp, karaciğer, taşlık, proventrikulus (ön mide) ve bağırsaklarının büyümesini geciktirdiğini bildirmişlerdir. Yapılan çalışmalar kuluçka sıcaklık değişimlerinin tavuk embriyo gelişimini olumsuz etkilediğini bildirmektedir (Leksrisompong ve ark. 2007, Maatjens ve ark. 2014, Maatjens ve ark. 2016a). Çalışmamızda kuluçka sıcaklığının 37.5°C'den 39.0°C'ye artırılmasının KAM'daki damar yoğunluğu, damar kalınlığı ve dal sayısında belirgin bir azalmaya neden olduğu tespit edildi. Aynı zamanda damar gelişiminin geri kalması ve buna bağlı olarak yeterli kan dolaşımının sağlanamamasının embriyo gelişimini olumsuz etkilediği kanaatindeyiz.

Maatjens ve ark. (2016a)'nın sıcaklığın tavuk embriyoları üzerindeki etkilerine yönelik yaptıkları çalışmalarında, farklı sıcaklıklara maruz kalan dömlü yumurtalardan elde edilen civcivlerin vücut ağırlığının yüksek inkübasyon sıcaklığından düşük inkübasyon sıcaklığına doğru kademeli bir azalma gösterdiğini ifade etmişlerdir. Hulet ve ark. (2007)'nin yaptıkları bir başka çalışmada ise 37.5°C'lik inkübasyon

sıcaklığındaki civciv ağırlığının 38.6°C ve 39.7°C'ye göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Ancak bu sonuçların aksine birçok çalışmada yüksek inkübasyon sıcaklığına maruz kalan dömlü yumurtalardan elde edilen civcivlerin ağırlığının daha düşük olduğu belirlenmiştir (Leksrisompong ve ark. 2007, Lourens ve ark. 2005, Molenaar ve ark. 2011). Çalışmamızda da bu sonuçlara benzer şekilde inkübasyon sıcaklığının artmasına bağlı olarak tavuk embriyo ağırlığının azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 1).

Maatjens ve ark. (2016b)'nin çalışmasında inkübasyonun son haftasındaki (inkübasyonun 15.-19. günleri arasında) sıcaklık değişikliklerinin tavuk embriyosu gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Civciv kalitesi ve organ gelişimine ait parametreler inkübasyondan sonraki 7. günde değerlendirilmiştir. İnkübasyon sıcaklığının 35.6°C ve 36.7°C olduğu gruplardan elde edilen civcivlerin ortalama boylarının (sırasıyla 20.5 cm, 20.6 cm) benzer olduğu, sıcaklığın 37.8°C ve 38.9°C'ye arttırıldığı gruplarda ise ortalama civciv boyunda azalmanın (sırasıyla 20.3 cm, 20.1 cm) olduğu ifade edilmiştir. Sunulan bu çalışmada ise embriyoların ortalama tepe-kıç uzunluk değeri 37.5°C'de daha yüksek bulunurken (18.08±1.72 mm); sıcaklık 39.0°C'ye yükseltildiğinde bu değer azaldığı (17.00±2.41 mm) görülmüştür.

Maatjens ve ark. (2014)'nin organ gelişimini değerlendirmeye yönelik çalışmasında tavuk embriyoları inkübasyonun 19. gününden son gününe kadar 36.7, 37.8 ve 38.9°C'lik üç farklı sıcaklığa maruz bırakılmıştır. Çalışma neticesinde 38.9°C'lik inkübasyon sıcaklığında diğer inkübasyon sıcaklıklarına göre kalp, mide ve karaciğer ağırlığının daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Yumurta inkübasyon sıcaklığı ve metabolik hız arasındaki pozitif ilişkinin kurulması çok önemlidir. Çünkü metabolik hız, embriyonun oksijen talebini yönlendirmektedir (Lourens ve ark. 2007, Romijn ve ark. 1956). Yapılan çalışmalar, inkübasyonun 15. gününden itibaren inkübasyon sıcaklığın 37.8°C'den

38.9°C'ye arttırılmasının normal olarak metabolik hızda ani bir artışla sonuçlandığını, bununda da embriyonik ısı üretimini dolayısıyla embriyonik büyüme ve gelişmeyi negatif yönde etkilediğini göstermiştir (Christensen ve ark. 1999, Lourens ve ark. 2006, Ricklefs 1987, Romanoff 1936). Bununla birlikte inkübasyon sıcaklığındaki azalma, koryoallantoik membranda kan akımının azalmasına neden olmaktadır. Bu da embriyo gelişimi esnasında olumsuz reaksiyonların gerçekleşmesini sağlamaktadır (Tzschentke, 2007). Oksijen ihtiyacının karşılanması ve kan akımının düzenli bir şekilde gerçekleşmesi iyi bir damar ağı gelişimi ile sağlanmaktadır. Kan damarlarının gelişimi sırasında vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmaları görev yapmaktadır (Risau, 1997).

Tavuk embriyolarında KAM modeli kullanılarak vaskülogenez ve anjiyogenez süreçleri incelenmektedir. KAM modelinde koryonik epitelyumun aktif göçü açıkça görülmektedir, vaskülogenez ve anjiyogenez süreçleri büyük ölçüde koryonik epitelyumun büyümesinden ve farklılaşmasından kaynaklanmaktadır (Ribatti, 2008). Birçok çalışmada inkübasyonun erken aşamalarında oluşan ve üstteki koryonik epitelyal hücrelerle yakından ilişkili bir kılcak pleksus oluşumu tanımlanmıştır (Ausprunk ve ark. 1974, Burton ve ark. 1989, Danchakoff 1917, Fanczi ve ark. 1979, Moscona 1959 Ribatti ve ark. 1998). Danchakoff (1917), mezenkimal kan damarlarından kaynaklanan ve koryonik epitelyumu istila eden, iyi perfüze edilmiş bir kılcak ağı ile sonuçlanan çok sayıda filiz tarif etmiştir. Burton ve ark. (1989) ise kısa vasküler tomurcukların arteriyel ve venöz taraftan mezenşimi işgal ettiğini ve inkübasyonun 6. gününde kılcak pleksus oluşumuyla sonuçlandığını bildirmiştir. De Fouw ve ark. (1989)'nın kapsamlı bir morfometrik araştırmasında, KAM yüzeyinin inkübasyon sürecinde 6. günde 6 cm²'den, 14. günde 65 cm²'ye hızlı bir şekilde genişlediğini göstermiştir. Bu süre zarfında, KAM yüzeyindeki besleyici damarların sayısının (prekapiller ve kapiller damarların sayısı 2.5 ve 5 kat oranında artmıştır) ağırlıklı olarak inkübasyonun 10. gününden sonra büyüme ve yeniden modelleme nedeniyle arttığını ifade etmişlerdir. Literatür bilgilerine göre inkübasyonun erken aşamalarında vaskülogenez ve anjiyogenez süreçlerinin başladığı görülmektedir. Aynı zamanda damar sayısı ve yoğunluğu artmakta böylelikle normal büyüme ve gelişme süreçleri devam etmektedir. Çalışmamızda ise 39.0°C sıcaklığa maruz kalan döller tavuk yumurtalarının, normal inkübasyon koşullarındaki (37.5°C ve %60±5 rölatif nemli ortam) döller tavuk yumurtalarına göre KAM yüzeyinde damar yoğunluğu, damar kalınlığı ve dal sayısında bir azalma olduğu belirlendi (Tablo 1). Buna bağlı olarak yeterli dolaşımın sağlanamamasıyla embriyolarda büyüme ve gelişmenin olumsuz yönde etkilendiği gözlemlendi.

Sonuç olarak; yeni bir bakış açısı oluşturmaya yönelik uyguladığımız KAM modelinin ileride yapılması planlanan çalışmalarda kullanılabilir olduğu ve literatüre katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

TEŞEKKÜR

➤ *Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKUHLADYEK)'ndan 14/01/2019 tarihli ve 49533702/08 sayılı etik kurul onayı alındı.*

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Auger N, Naimi AI, Smargiassi A, Lo E, Kosatsky T.** Extreme heat and risk of early delivery among preterm and term pregnancies. *Epidemiology*. 2014; 25:344-350.
- Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J.** Differentiation of the vascular endothelium in the chick chorioallantois: A structural and autoradiographic study. *Dev Biol*. 1974; 38:237-247.
- Basu R, Chen H, Li DK, et al.** The impact of maternal factors on the association between temperature and preterm delivery. *Environ Res*. 2017; 154:109-114.
- Basu R, Malig B, Ostro B.** High ambient temperature and the risk of preterm delivery. *Am J Epidemiol*. 2010; 172:1108-1117.
- Bettencourt MC, Bauer JJ, Sesterhenn IA, Connelly RR, Moul JW.** CD34 immunohistochemical assesment of angiogenesis as a prognostic marker for prostate cancer recurrence after radical prostatectomy. *The Journal of Urology*. 1998; 160:459-65.
- Burton GJ, Palmer ME.** The chorioallantoic capillary plexus of the chicken egg: A microvascular corrosion casting study. *Scanning Microsc*. 1989; 3:549-558.
- Christensen VL, Donaldson WE, Nestor KE.** Length of the plateau and pipping stages of incubation affects the physiology and survival of turkeys. *Br Poult Sci*. 1999; 40:297-303.
- Costa C, Soares R, Schmitt F.** Angiogenesis: now and then. *APMIS*. 2004; 112:402-412.
- Danchakoff V.** The position of the respiratory vascular net in the allantois of the chick. *Am J Anat*. 1917; 21:407-419.
- Dupertuis YV, Delie F, Cohen M, Pichard C.** In ovo method for evaluating the effect of nutritional therapies on tumor development, growth and vascularization. *Clinical Nutrition Experimental*. 2015; 2:9-17.
- Ertekin T, Bilir A, Aslan E, Koca B, Turamanlar O, Ertekin A, Albay S.** The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Folia Morphol (Warsz)*. 2019; 78(2):307-313.
- Fanczi T, Feher S.** Ultrastructural studies of chicken embryo CAM during incubation. *Anat Histol Embryol*. 1979; 8:151-159.
- Folkman J.** How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res*. 1986; 46(2):467-73.
- French NA.** Effect of incubation temperature on the gross pathology of turkey embryos. *Br Poult Sci*. 1994; 35:363-371.

- Guvenc Y, Billur D, Aydin S, Ozeren E, Demirci A, Alagoz F, Dalgic A, Belen D.** Metamizole Sodium Induces Neural Tube Defects in a Chick Embryo Model. *Turk Neurosurg.* 2016; 26(3):445-8.
- Guvenc Y, Dalgic A, Billur D, Karaoglu D, Aydin S, Daglioglu E, Ozdol C, Nacar OA, Yildirim AE, Belen D.** The effects of levetiracetam on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Turk Neurosurg.* 2013; 23(5):617-22.
- Ha S, Liu D, Zhu Y, Kim SS, Sherman S, Mendola P.** Ambient temperature and early delivery of singleton pregnancies. *Environ Health Perspect.* 2017a; 125:453-459.
- Ha S, Zhu Y, Liu D, Sherman S, Mendola P.** Ambient temperature and air quality in relation to small for gestational age and term low birthweight. *Environ Res.* 2017b; 55:394-400.
- Hagedorn HG, Nerlich AG.** Microvessel density and endothelial basement membrane composition in laryngeal squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol.* 2000; 120:891-98.
- Hamburger V, Hamilton HL.** A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn.* 1992; 195(4):231-72.
- Hazel SJ.** A novel early chorioallantoic membrane assay demonstrates quantitative and qualitative changes caused by antiangiogenic substances. *J Lab Clin Med.* 2003; 141:217-228.
- Hulet R, Gladys G, Hill D, Meijerhof R, El-Shiekh T.** Influence of egg shell embryonic incubation temperature and broiler breeder flock age on posthatch growth performance and carcass characteristics. *Poult Sci.* 2007; 86(2):408-412.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N.** Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease. 7th edition, Philadelphia, Pennsylvania. Elsevier Saunders Company. 2005; 87-119.
- Leng T, Miller JM, Bilbao KV, et al.** The chick chorioallantoic membrane as a model tissue for surgical retinal research and simulation. *Retina.* 2004 Jun; 24(3):427-434.
- Leksrisompong N, Romero-Sanchez H, Plumstead PW, Brannan KE, Brake J.** Broiler incubation. 1. Effect of elevated temperature during late incubation on body weight and organs of chicks. *Poult Sci.* 2007; 86(12):2685-2691.
- Logan A.** Angiogenesis. *Lancet.* 1993; 341:1467-1468.
- Lourens A, van den Brand H, Meijerhof R, Kemp B.** Effect of eggshell temperature during incubation on embryo development, hatchability, and posthatch development. *Poult Sci.* 2005; 84(6):914-920.
- Lourens A, van den Brand H, Heetkamp MJW, et al.** Effect of egg size on heat production and the transition of energy from egg to hatchling. *Poult Sci.* 2006; 85:770-776.
- Lourens A, van den Brand H, Heetkamp MJ, Meijerhof R, Kemp B.** Effects of eggshell temperature and oxygen concentration on embryo growth and metabolism during incubation. *Poult Sci.* 2007; 86(10):2194-2199.
- Maatjens CM, van Reijrink IA, Molenaar R, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H.** Temperature and CO₂ during the hatching phase. I. Effects on chick quality and organ development. *Poult Sci.* 2014; 93(3):645-654.
- Maatjens CM, van Roover-Reijrink IA, Engel B, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H.** Temperature during the last week of incubation. I. Effects on hatching pattern and broiler chicken embryonic organ development. *Poult Sci.* 2016a; 95(4):956-965.
- Maatjens CM, van Roover-Reijrink IA, van den Anker I, Engel B, van der Pol CW, Kemp B, van den Brand H.** Temperature during the last week of incubation. II. Effects on first week broiler development and performance. *Poult Sci.* 2016b; 95(9):2136-2144.
- Mangir N, Raza A, Haycock JW, Chapple C, Macneil S.** An improved in vivo methodology to visualise tumour induced changes in vasculature using the chick chorionic allantoic membrane assay. *In Vivo.* 2018; 32(3):461-472.
- Meijerhof R.** The influence of incubation on chick quality and broiler performance. Proceedings of the 20th Australian Poultry Science Symposium, 2009, Sydney, New South Wales, Australia, 9-11th February 2009. 2009; pp.167-170.
- Molenaar R, Hulet R, Meijerhof R, Maatjens CM, Kemp B, van den Brand H.** High eggshell temperatures during incubation decrease growth performance and increase the incidence of ascites in broiler chickens. *Poult Sci.* 2011; 90(3):624-632.
- Moscona A.** Squamous metaplasia and keratinization of chorionic epithelium of the chick embryo in egg and culture. *Dev Biol.* 1959; 1:1-23.
- Nicholson B, Theodorescu D.** Angiogenesis and prostate cancer tumor growth. *J Cell Biochem.* 2004; 91(1):125-150.
- Norrby K.** In-vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2006; 10:588-612.
- Oral M, Çakar S.** Deneysel hayvan çalışmalarında etik prensipler. *Anestezi Dergisi* 2005; 13(2):75-82.
- Özgürtaş Y.** Anjiyogeneizde bir in-vivo model: civciv koriyoallantoik membran. *Gülhane Tıp Dergisi* 2009; 51:67-69.
- Peng CC, Hsieh CL, Lin LY, Chyau CC, Cheng YT, Chen KC, Peng RY.** Anisotropic diffusion deviates chicken embryo chorioallantoic membrane assay (CAM) to reflect inherent therapeutic behaviors. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2009; 70(1):29-34.
- Ribatti D, Bertossi M, Nico B, Vacca A, Ria R, Riva A, Roncali L, Presta M.** Role of basic fibroblast growth factor in the formation of the capillary plexus in the chick embryo chorioallantoic membrane. An in situ hybridization, immunohistochemical and ultrastructural study. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1998; 30:127-136.
- Ribatti D.** Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2008; 270:181-224.
- Ribatti D.** The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res.* 2014 Nov 1; 328(2):314-24.
- Ribatti D.** The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev.* 2016; 141:70-77.
- Ricklefs RE.** Comparative analysis of avian embryonic growth. *J Exp Biol.* 1987; 1:309-323.
- Risau W.** Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 1997; 386:671-674.
- Romanoff AL.** Effects of different temperatures in the incubator on the prenatal and postnatal development of the chick. *Poult Sci.* 1936; 15:311-315.

- Romijn C, Lokhorst W.** The caloric equilibrium of the chicken embryo. *J Physiol.* 1956; 150:239-249.
- Saraydarođlu Ö, Özuysal S, Bilgin T.** İnvaziv serviks karsinomlarında anjiogenezin prognostik faktörler üzerine etkisi. *Türk Patoloji Dergisi.* 2004; 20(1-2):14-17.
- Schlatter P, König MF, Karlsson LM, Burri PH.** Quantitative study of intussusceptive capillary growth in the chorioallantoic membrane (CAM) of the chicken embryo. *Microvasc Res.* 1997; 54:65-73.
- Strand LB, Barnett AG, Tong S.** Maternal exposure to ambient temperature and the risks of preterm birth and stillbirth in Brisbane, Australia. *Am J Epidemiol.* 2012; 175(2):99-107.
- Strohmeier D, Rössing C, Bauerfeind A, Kaufmann O, Schlechte H, Bartsch G, Loening S.** Vascular endothelial growth factor and its correlation with angiogenesis and p53 expression in prostate cancer. *Prostate.* 2000; 45:216-224.
- Townsend CM, Beauchamp DR, Evers MB, Mattox KL.** Sabiston textbook of surgery: the biological basis of modern surgical practice. 17th ed. Elsevier Saunders, Philadelphia, 2004.
- Tzschentke B.** Attainment of thermoregulation as affected by environmental factors. *Poult. Sci.* 2007; 86:1025–1036.
- Zhang JJ, Jo JO, Huynh DL, Ghosh M, Kim N, Lee SB, Lee HK, Mok YS, Kwon T, Jeong DK.** Lethality of inappropriate plasma exposure on chicken embryonic development. *Oncotarget.* 2017; 8(49):85642–85654.
- Zhang Y, Yu C, Wang L.** Temperature exposure during pregnancy and birth outcomes: an updated systematic review of epidemiological evidence. *Environ Pollut.* 2017; 225:700-712.

Meta-analysis of Prevalence of *Cronobacter sakazakii* in Foods Consumed in Turkey

Serhat AL^{1*}, Adalet DIŞHAN¹, Elif ÇELİK², Aytaç AKÇAY²

¹Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Food Hygiene and Technology Department, Kayseri, Turkey

²Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Biometry Department, Kayseri, Turkey

ABSTRACT

In this study, it is aimed to make meta-analysis of the prevalence of *Cronobacter sakazakii* in various foods consumed in Turkey. The prevalences of *C. sakazakii* detected in the different independent studies were combined to provide a common prevalence estimate and heterogeneities between studies were investigated. The study material consisted of 22 studies investigating *C. sakazakii* prevalence in a total of 2463 food samples included infant formula, infant formula ingredients, milk and dairy products and meat and meat products between the years 1997-2019 was carried out in Turkey. As a result of the meta-analysis, the common prevalence of *C. sakazakii* was detected as (%95 Confidence Interval; 0.021-0.044) for all studies. In the evaluated studies, infant formula, infant formula ingredients, milk and dairy products and meat and meat products were identified as sub-groups due to sufficient prevalence data and meta-regression analysis was applied between sub-groups. Accordingly, the prevalence of *C. sakazakii* in infant formula, infant formula ingredients, milk and dairy products and meat and meat products were determined as 0.01 (0.00-0.01), 0.11 (0.04-0.18), 0.05 (0.02-0.08) and 0.03 (0.00-0.06) in Turkey, respectively. Heterogeneities due to sampling size of studies on the presence of *C. sakazakii* in foods consumed in Turkey were corrected and main prevalence of the pathogen in Turkey is calculated. The study concluded that the pathogen is epidemiologically important and effective implementation of food safety management systems in the food production chain is necessary for public health.

Keywords: *Cronobacter sakazakii*, meta-analysis, prevalence

Türkiye’de Tüketime Sunulan Gıdalarda *Cronobacter sakazakii* Prevalanslarının Meta-analiz ile Belirlenmesi

ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye’de tüketime sunulan çeşitli gıdalarda tespit edilen *Cronobacter sakazakii* prevalanslarının meta-analizinin yapılması amaçlanmıştır. Birbirinden bağımsız olarak yapılmış çalışmalarda belirlenen *C. sakazakii* prevalansları birleştirilerek Türkiye için ortak prevalans kestirimi sağlanmış ve çalışmalar arası heterojenlikler araştırılmıştır. Çalışma materyalini, 2008-2019 yılları arasında Türkiye’de yapılmış *C. sakazakii* prevalansının belirlendiği 22 adet çalışma ve bu çalışmalarda incelenen 2463 gıda numunesi oluşturmuştur. Meta-analiz sonucunda *C. sakazakii* ortak prevalans değeri 0.033 (%95 Güven aralığı; 0.021-0.044) olarak bulunmuştur. İncelenen çalışmalarda bebek maması, bebek maması yapımında kullanılan hammaddeler, süt ve süt ürünleri ve et ve et ürünleri, yeterli prevalans verisi bulunduğu alt gruplar olarak belirlenmiş ve alt gruplar arası meta-regresyon analizi uygulanmıştır. Çalışma bulgularına göre Türkiye’de *C. sakazakii* prevalansı; bebek maması, bebek maması hammaddeleri, süt ve süt ürünleri ve et ve et ürünlerinde sırasıyla 0.01 (0.00-0.01), 0.11 (0.04-0.18), 0.05 (0.02-0.08) ve 0.03 (0.00-0.06) olarak ortaya konulmuştur. Türkiye’de tüketime sunulan gıdalarda *C. sakazakii* varlığına ilişkin yapılan çalışmaların örneklem büyüklüğüne bağlı olarak göstermiş oldukları heterojeniteler giderilmiş ve patojenin Türkiye geneli ortak prevalansı hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda etkenin epidemiyolojik olarak önemli olduğu ve üretim zincirinde gıda güvenliği yönetim sistemlerinin etkin olarak uygulanmasının halk sağlığı açısından gerekli olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Cronobacter sakazakii*, meta-analiz, prevalans

To cite this article: Al S. Dişhan A. Çelik E. Akçay A. Meta-analysis of Prevalence of *Cronobacter sakazakii* in Foods Consumed in Turkey. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):69-76.

Submission: 16.12.2019 Accepted: 17.02.2020 Published Online: 23.02.2020

ORCID ID; SA: 0000-0003-2721-9275, AD: 0000-0001-8097-1648, EÇ: 0000-0002-5073-1907, AA: 0000-0001-6263-5181

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

GİRİŞ

Cronobacter sakazakii; gram-negatif, sporsuz, peritrik flagellaları ile hareketli, çubuk şekilli, fakültatif anaerobik özellikte, Enterobacteriaceae familyasına mensup olan gıda kaynaklı bir patojendir (Kucerova ve ark. 2010, Li ve ark. 2014, Hu ve ark. 2018). İlk olarak *Enterobacter sakazakii* olarak isimlendirilen etken, Iversen ve ark. (2008) tarafından *C. sakazakii* olarak yeniden sınıflanmıştır. *Cronobacter spp.*'nin *C. sakazakii*, *C. turicensis*, *C. universalis*, *C. dublinensis*, *C. malonaticus* ve *C. mytjensii* olmak üzere altı türünün gıda kaynaklı patojenler olduğu farklı çalışmalarda bildirilmektedir (Li ve ark. 2014, Garbowska ve ark. 2015, Hu ve ark. 2018). Bu altı tür, stres toleransı ve virülans özellikleri bakımından birbirlerinden farklıdır. *Cronobacter* türleri çeşitli gıda ve çevresel örneklerden izole edilen fırsatçı patojenler olup enfeksiyonları başta yenidoğanlarda, çocuklarda ve yaşlılarda olmak üzere tüm yaş gruplarında rastlanmaktadır. (CDC 2011, Aksu ve ark. 2019). *C. sakazakii*, intestinal duvar ve kan-beyin bariyerinden geçiş yapabilme kabiliyetinde, hücresel dejenerasyon şekillendiren endotoksin üretmektedir (Holy ve Forstythe 2014). Nekrotizan enterokolit, septisemi ve menenjit şekillenebilen enfeksiyon tablolarında, bebeklerde mortalitenin %40'a yakın olduğu rapor edilmektedir (Holy ve Forstythe 2014). Infant ve bebeklerde görülen enfeksiyonların %90'dan fazlası epidemiyolojik olarak toz bebek formülleri ile ilişkilendirilmektedir (Li ve ark. 2014, Kalyantanda ve ark. 2015). *C. sakazakii*, yenidoğanlar için kontamine toz bebek formülleri ve devam mamaları ile ilişkilendirilse de tahıllar, baharatlar, ekmek, et ve et ürünleri, peynir gibi süt ürünleri, yumurta ve sebze ve meyveler gibi çeşitli gıdalarda da bulunduğu bildirilmektedir (Friederman ve ark. 2007). *C. sakazakii*, 6-45°C arasında üreyebilmesi, ısıya, ultraviyole ışığa, radyasyona, oksijen radikallerine, mide asitliğine dirençli olması, dehidre ve su aktivitesi düşük toz bebek mamalarında 2 yıla kadar canlılığını koruyabilmesi gibi nedenlerle büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Iversen ve ark. 2004, Kalyantanda ve ark. 2015). Bununla birlikte, kötü hijyenik koşullar ve kontamine alet ve ekipmanlar, besin bileşenlerinin bu bakteri ile kontamine olmasına yol açmaktadır (Jaradat ve ark. 2014).

Pek çok ülkede infant formülleri için mikrobiyolojik kriterlerde *C. sakazakii* sıfır tolerans olarak kabul edilmektedir (Codex 2008, EC 2007, FSANZ 2016). Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'ne göre ise bebek formülleri ve devam formüllerinde (özel tıbbi amaçlı diyet gıdalar dahil) 25 g numunede *C. sakazakii* bulunmaması gerektiği belirtilmektedir (TGGK 2011). *C. sakazakii* prevalansına ilişkin yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu prevalansların değişkenliği daha kesin sonuçların elde edilmesi ihtiyacını doğurmuştur. Bu ihtiyaca çözüm olabilecek yöntemlerden biri meta-

analiz yöntemidir. Meta-analiz, birbirinden bağımsız çalışmalardan elde edilen etki büyüklüklerinin uygun model altında birleştirilerek ortak etki büyüklüğü elde edilmesi yöntemidir. Meta-analiz ile örneklem genişliği artırılarak kesinliği ve gücü daha yüksek olan parametreler elde edilebilmektedir. Bu sebeple, meta-analiz çalışmaları giderek önem kazanmaktadır (Sutton ve ark. 2001). Bu çalışmada, Türkiye'de 2008-2019 yılları arasında gerçekleştirilmiş, tüketime sunulan çeşitli gıdalarda *C. sakazakii* prevalansının belirlendiği çalışmalar göz önünde bulundurulurken Türkiye'de ortak *C. sakazakii* prevalansının meta-analiz ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma materyalini 2008-2019 yılları arasında Türkiye'de yapılmış gıdalarda *C. sakazakii* prevalansını hesaplandığı 22 adet çalışmadan elde edilen 36 prevalans bulgusu oluşturmuştur. Çalışmaların analize dahil etme kriterlerini gösteren akış şeması Şekil 1'de verilmiştir. Meta-analizine bebek mamaları, bebek maması hammaddeleri, süt ve süt ürünleri, kırmızı et ve et ürünleri ve diğer gıdalardan alınan toplam 2463 gıda numunesi dahil edilmiştir

Türkiye'de *C. sakazakii* prevalansı ile ilgili yapılmış olan ve meta-analizine dahil edilen çalışmalara ilişkin bilgiler ise Tablo 1'de verilmiştir.

Meta-analizine dahil edilen çalışmaların çalışma etki büyüklüklerinin ve standart hataların doğrusal olup olmadığını belirlemek için Egger'in Doğrusal Regresyon testi kullanılmıştır. Yayın yanlılığının giderilmesi için Duval ve Tweedie (2000)'nin Trim and Fill yöntemi uygulanarak ortak prevalans değeri tekrar hesaplanmıştır. Çalışma içi varyansın yanı sıra çalışmalar arasındaki varyansı tespit etmek amacıyla rastgele etki modeli (DerSimonian-Laird yöntemi) kullanılmıştır. Çalışmaların etki büyüklüklerine ait heterojenliğin değerlendirilmesinde (k-1) serbestlik dereceli Cochrane's Q istatistiği, heterojenlik seviyesini belirlemek için I^2 istatistiği ve çalışmalar arasındaki gerçek varyansın tespiti için τ^2 istatistiği kullanılmıştır. I^2 değeri, Patsopoulos ve ark. tarafından (2008) önerilen üç kategori (%25'in altında ise düşük, %25-50 arası orta, %50'nin üzeri yüksek heterojenlik) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada gıda türlerine göre (bebek mamaları, bebek maması hammaddeleri, süt ve süt ürünleri ve kırmızı et ve et ürünleri) oluşturulan alt gruplar arasında heterojenlik ölçümü yapılarak, ortak etki büyüklükleri bakımından karşılaştırmalar yapılmıştır. Meta-regresyon analizinde, bağımlı değişken etki büyüklüğü (*C. sakazakii* prevalansı) olup, bağımsız değişken (gıda türleri) ile arasındaki ilişki belirlenerek modellenmiştir. Meta-regresyon analizi sonucunda elde edilen belirtme katsayısı (R^2) istatistiği ile gerçek etkilerdeki varyansın ne kadarının bağımsız değişken tarafından

açıklandığı hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında analizler R 3.6.1 (www.r-project.org) kullanılarak yapılmıştır.

BULGULAR

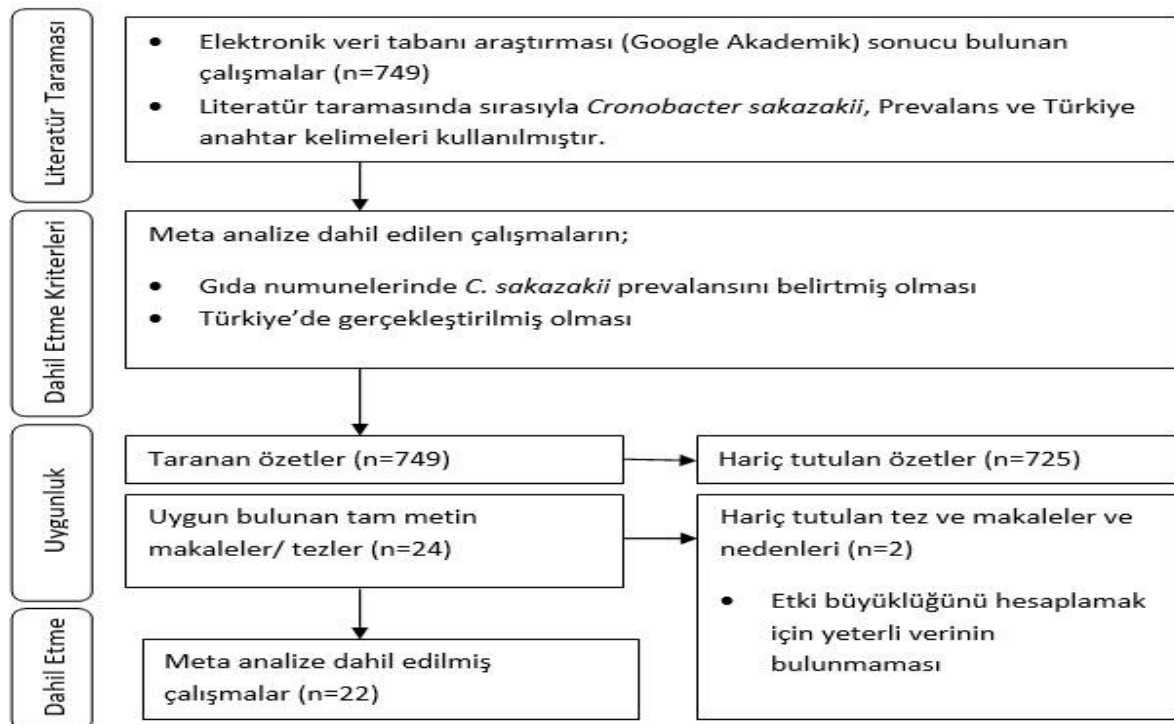
Yapılan meta-analiz sonucunda Türkiye’de satışa sunulan gıdalarda *C. sakazakii* ortak prevalans değeri 0.033 (%95 Güven aralığı; 0.021-0.044) olarak hesaplanmış olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu ortaya konmuştur ($p < 0.001$). Egger’in Doğrusal Regresyon testi sonucunda çalışma örnekleminin yanlı olduğu belirlenmiştir (t-değeri: 7.47, $p < 0.001$). Meta-analiz sonucunda çalışmalar arasında heterojenlik bulunmuştur ve gözlenen etkilerdeki varyans gerçek etkilerdeki varyansın %71’ni vermektedir (Cochrane’s $Q = 120.76$, $df = 35$, $I^2 = 71$). Bu nedenle rastgele etki modeli kullanılmıştır. Burada Cochrane’s Q istatistiği gözlenen etki büyüklüklerinin ağırlıklı kareler toplamını göstermektedir. Çalışmada elde edilen huni grafiği Şekil 2’de gösterilmektedir.

Çalışmalar kapsamında uygulanan Trim and Fill yönteminde yayın yanlılığının giderilmesi için analize 14 ayrı prevalans değeri eklenmiştir. Bunun sonucunda ortak prevalans 0,012 (%95 Güven aralığı; 0.00-0.025) ve Cochrane’s Q istatistiği ise 228.94 olarak düzeltilmiştir.

Alt grup analizlerinde bebek mamaları, bebek maması hammaddeleri, süt ve süt ürünleri ve kırmızı et ve et ürünleri için ortak prevalans değerleri hesaplanmış; gıda türleri arasındaki ilişkileri belirlemek için ise meta-regresyon analizi yapılmıştır. Tablo 2’de gıda türlerine göre yapılan altgrup analizlerinde ortak

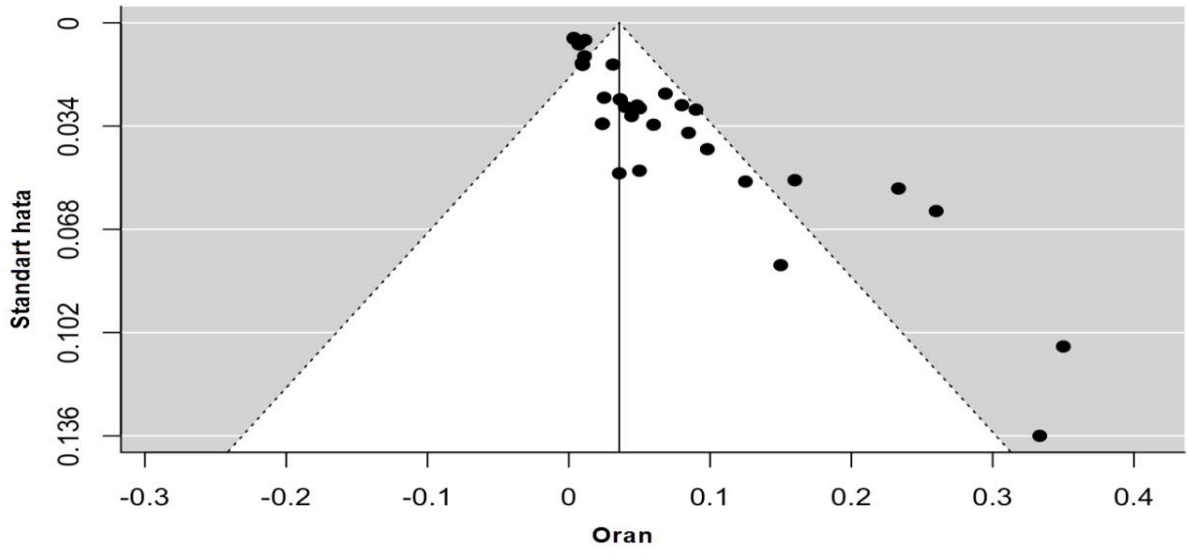
prevalans ve güven aralıkları, Cochrane’s Q , I^2 ve τ^2 test istatistikleri verilmiştir. Altgrup analizi sonucunda gıda türlerine göre *C. sakazakii* prevalansının değişiklik gösterdiği ve gıda türlerinin ortak prevalans üzerinde anlamlı bir etkisinin bulunduğu görülmüştür ($Q = 17.21$, $df = 3$, $p < 0.001$). Buna göre, en düşük *C. sakazakii* prevalansı (0.005 (CI: 0.00-0.01), $Q = 9.92$, $df = 11$, $I^2 = 0.0$) bebek mamalarında bulunurken, en yüksek prevalans değeri ise bebek maması yapımında kullanılan hammaddelerde (0.11 (CI: 0.04-0.18), $Q = 13.81$, $df = 4$, $I^2 = 71$) olduğu belirlenmiştir. Gıda tiplerine göre belirlenmiş olan alt gruplarda *C. sakazakii* prevalans değerleri Şekil 3’de detaylı olarak gösterilmiştir.

Meta-regresyon analizine göre *C. sakazakii* prevalansı gıda türlerine göre değişmektedir ($p < 0.05$) (Tablo 3). Bebek maması yapımında kullanılan hammaddelerde ve süt ve süt ürünlerinde bebek mamalarına göre daha yüksek *C. sakazakii* riski hesaplanmış ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Fakat, kırmızı et ve et ürünlerinin *C. sakazakii* prevalansı üzerindeki etkisi anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Regresyon modeline göre gerçek etkilerdeki varyansın %47’si gıda türleri tarafından açıklanmaktadır (R^2 Analog=0,47). Marul, çilek, kırmızı biber, baharatlar, karides, şekerleme, hazır toz çorba ve meyve ve sebzeler gibi gıda matrislerinde belirlenen *C. sakazakii* prevalans verileri söz konusu etkenin genel prevalansının belirlenmesinde göz önünde bulundurulmuş ancak yeterli sayıda çalışma olmadığı için alt grup ve meta-regresyon analizlerinde kapsam dışı bırakılmıştır.

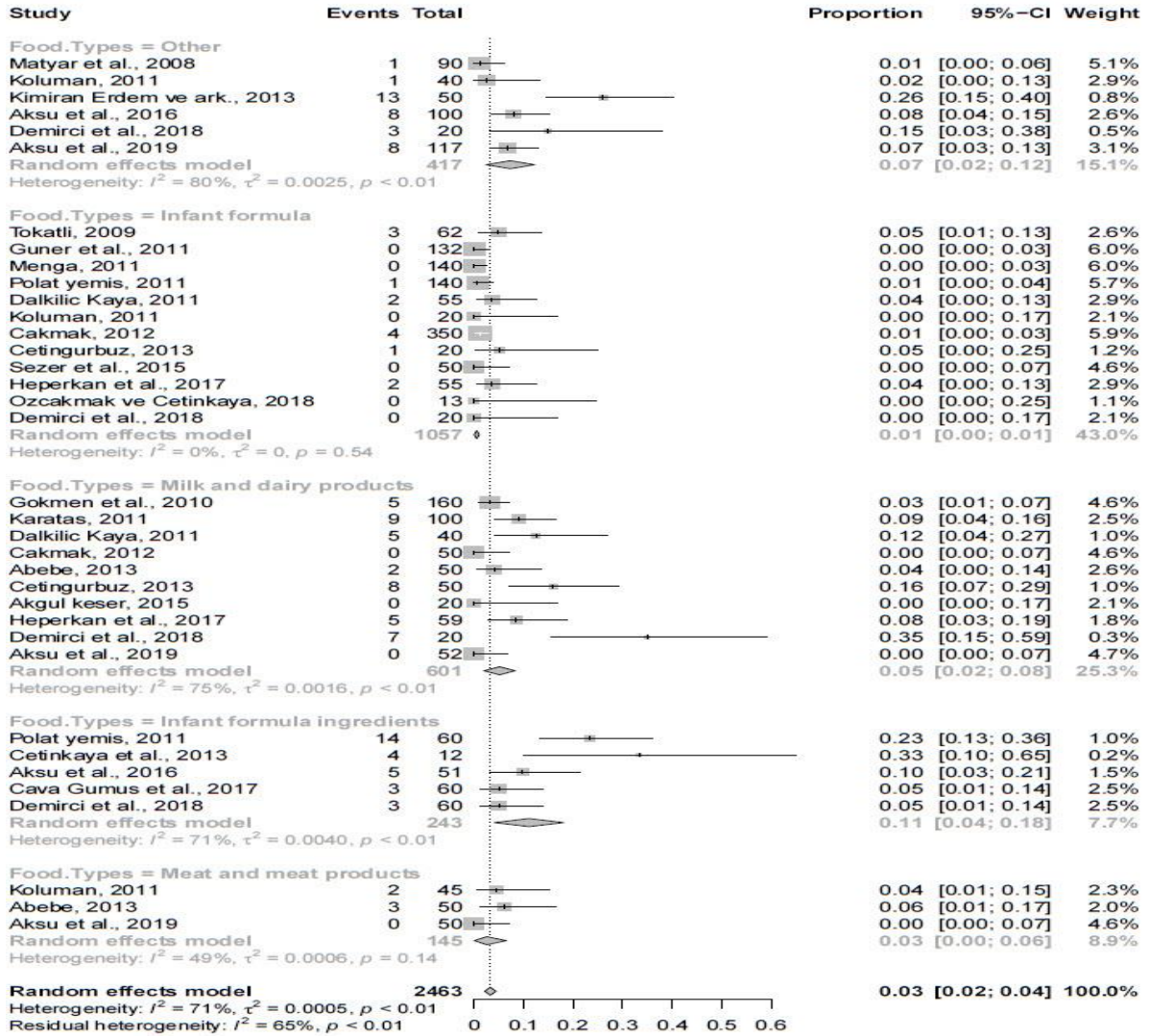


Şekil 1. Çalışmaların Meta-analize dahil etme kriterleri ile ilgili akış şeması

Figure 1. Flow diagram of the criteria for selection of studies in the meta-analysis



Şekil 2. 2008-2019 yılları arasında yayınlanmış *C. sakazakii* prevalans çalışmaları örneklemelerine ait huni grafiği (n = 22)
 Figure 2. Funnel plot for estimates in meta-analysis of *C. sakazakii* prevalence studies published from 2008 to 2019 (n = 22)



Şekil 3. *C. sakazakii* prevalans çalışmalarına ait orman grafiği
 Figure 3. Forest plot of the prevalence of *C. sakazakii* studies

Tablo 1. Türkiye’de 2008-2019 yılları arasında *C. sakazakii* prevalansı ile ilgili yapılmış olan ve meta-analize dahil edilen çalışmaların özellikleri

Table 1. Characteristics of *C. sakazakii* prevalence studies included in the meta-analysis in Turkey between 2008-2019

Çalışma	Numune sayısı	Pozitif numune sayısı	Prevalans	Gıda Türü
Matyar ve ark. 2008	90	1	0.01	Diğer
Tokatlı 2009	62	3	0.05	Bebek Maması
Gökmen ve ark. 2010	160	5	0.03	Süt ve Süt Ürünleri
Güner ve ark. 2011	132	0	0	Bebek Maması
Karataş, 2011	100	9	0.09	Süt ve Süt Ürünleri
Menga, 2011	140	0	0	Bebek Maması
Polat Yemiş 2011	140	1	0.01	Bebek Maması
	60	14	0.23	Bebek Maması Hammaddeleri
Dalkılıç Kaya 2011	55	2	0.04	Bebek Maması
	40	5	0.13	Süt ve Süt Ürünleri
	20	0	0	Bebek Maması
Koluman 2011	45	2	0.04	Et ve Et Ürünleri
	40	1	0.03	Diğer
Çakmak 2012	350	4	0.01	Bebek Maması
	50	0	0	Süt ve Süt Ürünleri
Abebe 2013	50	2	0.04	Süt ve Süt Ürünleri
	50	3	0.06	Et ve Et Ürünleri
Cetinkaya ve ark. 2013	12	4	0.33	Bebek Maması Hammaddeleri
Çetingürbüz 2013	50	8	0.16	Süt ve Süt Ürünleri
	20	1	0.05	Bebek Maması
Kimiran Erdem ve ark. 2013	50	13	0.26	Diğer
Sezer ve ark. 2015	50	0	0	Bebek Maması
Akgül Keser 2015	20	0	0	Süt ve Süt Ürünleri
Aksu ve ark. 2016	51	5	0.1	Bebek Maması Hammaddeleri
	100	8	0.08	Diğer
Heperkan ve ark. 2017	59	5	0.08	Süt ve Süt Ürünleri
	55	2	0.04	Bebek Maması
Cava Gümüş ve ark. 2017	60	3	0.05	Bebek Maması Hammaddeleri
Ozcakmak ve Cetinkaya. 2018	13	0	0	Bebek Maması
	20	0	0	Bebek Maması
Demirci ve ark. 2018	60	3	0.05	Bebek Maması Hammaddeleri
	20	7	0.35	Süt ve Süt Ürünleri
	20	3	0.15	Diğer
	52	0	0	Süt ve Süt Ürünleri
Aksu ve ark. 2019	50	0	0	Et ve Et Ürünleri
	117	8	0.07	Diğer
Toplam	2463	122	0.03	

Bebek Maması; Yeni Doğan ve Devam Formülleri

Bebek Maması Hammaddeleri; İrmik, Pirinç Unu, Nişasta, Çavdar Unu, Yulaf Unu, Rezene

Et ve Et Ürünleri; Kıyma

Süt ve Süt Ürünleri; Süt, Süt Tozu, Peyniraltı Suyu Tozu, Peynir

Diğer; Marul, Çilek, Kırmızı Biber, Baharat/Otlar, Karides, Şekerleme, Tüketime Hazır Gıdalar, Hazır Çorba, Meyve ve Sebzeler, Çevresel Toz

Tablo 2. Gıda türlerine göre yapılan alt grup analizleri**Table 2.** Subgroup analysis according to food types

Değişkenler	<i>C. sakazakii</i> Prevalansları					Heterojenlik			
	Gıda Türleri	Çalışma sayısı	Örnek Sayısı	Pozitif örnek sayısı	Prevalans	%95 GA	P Değeri	Cochrane's Q	I ² (%)
Bebek maması	12	1057	13	0.01	(0.00-0.01)	0.54	9.92	0	<0.001
Bebek maması hammaddeleri	10	243	29	0.11	(0.04-0.18)	<0.01	13.81	71	0.004
Süt ve süt ürünleri	5	601	41	0.05	(0.02-0.08)	<0.01	35.49	75	0.002
Et ve et ürünleri	3	145	5	0.03	(0.00-0.06)	0.14	3.89	49	0.001

Cochrane's Q: Gözlenen etki büyüklüklerinin ağırlıklı kareler toplamı;

I² %: Gerçek varyansın gözlenen varyansa oranı;

τ²: Gerçek etkilerdeki çalışmalar arası varyans;

GA: Güven Aralığı

Tablo 3. Farklı gıda türlerinde gözlenen *C. sakazakii* prevalanslarının meta-regresyon analizleri**Table 3.** Meta-regression analysis of the prevalence of *C. sakazakii* in food subgroups

Gıda Türleri	N	Katsayı	SH	Z-değeri	P Değeri	İstatistik önem kontrolü (Cochrane's Q)
Sabit	30	0.01	0.007	1.43	0.153	Q= 15.266
Bebek maması (Referans)	12	0.00	-	-	-	df=3
Bebek maması hammaddeleri	10	0.07	0.021	3.66	<0.001	P: 58.80
Süt ve süt ürünleri	5	0.03	0.012	2.07	0.039	P=0.002
Et ve et ürünleri	3	0.01	0.018	0.64	0.521	

N: Çalışma sayısı; **SH:** Standart Hata; **R² Analog= 0.47**

TARTIŞMA

Meta-analiz, birbirinden bağımsız ve aynı etki büyüklüğünü ihtiva eden çalışmaların sonuçlarının birleştirilip yeniden yorumlanmasını hedefleyen bir yöntemdir. Bu yöntem, bazı dezavantajları olduğu düşünülmeye karşın popülasyon gerçek etki büyüklüğüne ilişkin daha güçlü ve kesin tahmin yapma ve bireysel çalışmalardaki tutarsızlıkların giderilmesi hususunda önemli bir yer edinmiştir. Meta-analizin kullanımı tıp, veteriner hekimlik, tarım ve eğitim gibi birçok alanda yaygınlaşmıştır. Meta-analiz çalışmaları daha çok sosyal bilimlerde yapılmakta ancak son zamanlarda sağlık bilimleri ve gıda güvenliği araştırmalarında da meta-analiz yapıldığı görülmektedir. Gıda mikrobiyolojisi açısından meta-analiz oldukça güncel ve amaca yönelik bir metot olarak değerlendirilmekte ve farklı patojenler ile ilgili birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Örneğin, Churchill ve ark. (2019), şarküteri eti, yumuşak peynir ve paketlenmiş salatadaki *Listeria monocytogenes* prevalansını meta-analiz ile ortaya koymayı amaçlamıştır. Assefa ve Bihon (2018), Etiyopya'da farklı hayvan kaynaklı gıdalarda *Escherichia coli* prevalans verilerini aynı metot ile bir araya getirmiştir. Gutema ve ark (2019), 2000-2017 yılları arasında yayınlanan çalışmaların meta-analizini uygulayarak sağlıklı sığırlarda *Salmonella*'nın ortak prevalansını tahmin etmeyi ve serotip çeşitliliğini incelemeyi amaçlamışlardır.

Türkiye'de farklı bölgelerde, çeşitli gıda tiplerinde *Cronobacter* ile ilgili prevalans çalışmaları bulunmaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'de satılan sunulan gıdalarda *C. sakazakii*'nin ortak prevalans oranını belirlemek amacıyla mevcut birincil

çalışmaların sonuçlarını nicel olarak birleştiren bir meta-analiz yapılarak ortak bir prevalans ortaya konulmuştur. *C. sakazakii*'ye ilişkin ortak prevalans değeri 0.03 (%95 Güven aralığı; 0.02-0.04) olarak hesaplanmış olup istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir (p<0.001). Buna karşın, Demirci ve ark (2018), *C. sakazakii* prevalansını 0.35 belirlemişken; Çakmak (2012), incelediği hiçbir gıda numunesinde *C. sakazakii* tespit etmemiştir. Bu şartlarda Türkiye'nin farklı bölgelerinde gerçekleştirilmiş olan bağımsız ve heterojen çalışma bulgularının istatistiksel olarak bir araya getirilmesi ile *C. sakazakii* prevalansı ile ilgili ülke genelini yansıtan net bir veri elde edildiği düşünülmektedir.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen alt grup analizlerinde, en yüksek *C. sakazakii* prevalansı bebek maması hammaddelerinde (0.11), en düşük prevalans ise bebek mamasında bulunmuştur (0.01). Çalışmaya dahil edilmiş olan bebek mamasına ilişkin en yüksek *C. sakazakii* prevalansı 0.48 (Tokatlı 2009) iken en düşük prevalans ise 0 olarak bulunmuştur. Bebek maması hammaddelerine ilişkin ise en yüksek prevalans 0.33 (Çetinkaya ve ark. 2013) olarak belirlenirken, en düşük prevalans ise 0.05 (Cava Gümüş ve ark. 2017, Demirci ve ark. 2018) olarak rapor edilmiştir. Sani ve Odeyemi (2015)'nin dünya genelinde *Cronobacter* spp. prevalans çalışmalarını bir araya getirdiği meta-analiz sonuçlarına göre, bitkisel kaynaklı gıda maddelerinde prevalans oranı 0.201 (%95 güven aralığı 0.168-0.238) olup *Cronobacter* spp. varlığının hayvansal gıdalara (0.08 (%95 güven aralığı 0.066-0.096)) oranla daha yaygın; heterojenlik açısından baharat ve sebze gibi bitkisel kaynaklı gıda maddelerinin (I² = 84), hayvansal gıdalara oranla (I² = 82) daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. Bitkisel

kaynaklı gıdaların *Cronobacter spp.*'ye rezervuar teşkil ederek kontaminasyon yolu oluşturduğu sonucuna ulaşılmıştır (Sani ve Odeyemi 2015). Bu çalışmada da bebek formüllerinde kullanılan bitkisel kaynaklı hammaddelerin (ırmık, pirinç unu, nişasta), diğer gıda maddelerine oranla *C. sakazakii* açısından yüksek prevalans gösterdiği sonucuna varılmıştır. Bu durumda çalışma sonuçlarının, Sani ve Odeyemi'nin (2015) bulguları ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Prevalans çalışmalarından yola çıkılarak, besin içeriklerinin tozlaştırılmış, kurutulmuş ve düşük su aktivitesine sahip olması özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, *C. sakazakii* özellikle bebek formülü üretiminde dirençli bir gıda patojeni olduğu bilinmektedir. Enterobacteriaceae ailesine ait olan ve düşük su aktivitesi seviyelerinde canlılığını uzun süre sürdüren *C. sakazakii*'nin toz bebek mamalarında ve kuru bileşenlerde bulunma olasılığı yüksektir. Bu durum nedeniyle hassas grupta yer alan infantlar *C. sakazakii* açısından tehlike altındadır. Van acker ve ark. (2001) tarafından bildirilen 12 yenidoğan bebekte görülen süt bazlı toz bebek mamalarından kaynaklandığı ortaya konmuş nekrotize enterokolitis ile karakterize *C. sakazakii* salgını, patojenin ciddiyetini ortaya koymaktadır. Bu sebeple hammadde eldesinden itibaren gıdanın tüketiciye sunulmasına kadar tüm gıda zincirinde gıda güvenliği uygun düzeyde tesis edilerek son üründe intrinsik ve ekstrinsik tüm kontaminasyon kaynakları elimine edilmelidir. Bu çalışma ile meta-analiz yönteminin gıda kaynaklı patojenlerin prevalanslarını belirlemede, böylece hastalık etkenlerinin elimine edilmesi için stratejilerin geliştirilmesinde ve yeni çalışma alanlarının belirlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışma ile Türkiye'de yapılmış *C. Sakazakii* prevalansı ile ilgili elektronik ortamda yayınlanmış tüm çalışmalara ulaşılmaya çalışılmış ve ortak prevalans değeri hesaplanmıştır. Ancak Çalışma kapsamında sonuçların daha güvenilir olması açısından çok sayıda makaleye ulaşmalı ve bunun ulusal değerlendirme yanı sıra uluslararası analizlerin de yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Türkiye çapında yapılacak meta-analiz, risk analiz çalışmaları ve nöral network tabanlı makine öğrenmesi gibi yeni teknolojik analiz yöntemlerinin gıda güvenliği ve öngörücü/tahminsel mikrobiyoloji alanlarında uygulanması gerekliliği halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abebe GM.** Çeşitli Gıda Örneklerinden İzole Edilen *Enterobacter Sakazakii*'nin Biyofilm Oluşumunun Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2013.
- Akgül Keser B.** Çikolata ve Sütli-Kremalı Keklerin Üretim Aşamalarında Potansiyel Risk Oluşturabilecek *Listeria monocytogenes*, *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii* ve

Salmonella spp. Patojen Bakterilerinin Real-Time PCR Yöntemi ile Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir, 2015.

- Aksu F, Sandıkcı Altunatmaz S, Issa G, Özmen Togay S, Aksu H.** Prevalence and identification by multiplex polymerase chain reaction patterns of *Cronobacter spp.* isolated from plant-based foods. Food Sci Technol. 2019; 36(4): 730-736.
- Aksu F, Sandıkcı Altunatmaz S, Ossa G, Aksoy A, Aksu H.** Prevalence of *Cronobacter spp.* in various foodstuffs and identification by multiplex PCR. Food Sci Technol. 2019; 39(3): 729-734.
- Anonim.** CDC update: investigation of *Cronobacter* infections among infants in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. 2011. <http://www.cdc.gov/foodsafety/diseases/cronobacter/2011-investigation/>; 2011. Erişim tarihi: 07 Aralık 2019.
- Anonim.** Codex Alimentarius Commission. CAC/RCP 66-2008. Code of Hygienic Practice for Powdered Formulae for Infants and Young Children. 2008. www.fao.org/input/download/standards/11026/CXP_066e.pdf. Erişim Tarihi: 08 Aralık 2019.
- Anonim.** Commission Regulation (EC). Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. 2007. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32007R1441&from=EN>. Erişim Tarihi: 08 Aralık 2019.
- Anonim.** FSANZ. Compendium of microbiological criteria for food. 2016. <https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria/Compendium%20of%20Microbiological%20Criteria.pdf>. Erişim Tarihi: 08 Aralık 2019.
- Anonim.** Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği 2011. 29 Aralık 2011 tarihli ve 28157 sayılı Resmi Gazete. Erişim Tarihi: 19.01.2020.
- Assefa A, Bihon A.** A systematic review and metaanalysis of prevalence of *Escherichia coli* in foods of animal origin in Ethiopia. Heliyon. 2018; 4: e00716.
- Cava Gümüş P, Tekiner İH, Çakmak B, Tacer Caba Z, Özpınar H.** Investigation of Extended Spectrum B-Lactamases(ESBL)-Producing Enterobacteriaceae and *Cronobacter spp.* in Infant Formulas and Cereal-Based Foods for Children. IGUSABDER. 2017; 1: 19-32.
- Churchill KJ, Jan M, Sargeant JM, Farber JM, O'connor AM.** Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Select Ready-to-Eat Foods-Deli Meat, Soft Cheese, and Packaged Salad: A Systematic Review and Meta-Analysis. J Food Prot. 2019; 82(2): 344-357.
- Çakmak B.** Piyasada Satışa Sunulan Çeşitli Bebek Mamalarında ve Pastörize Sütlerde *Enterobacter Sakazakii*'nin Varlığı. Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2012.
- Çetingürbüz B.** Hazır Toz Bebek Mamaları ve Çiğ Sütlerde *Enterobacter Sakazakii*'nin Bulunma Sıklığı. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2013.
- Çetinkaya E, Joseph S, Ayhan K, Forsythe SJ.** Comparison of methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in the preparation of infant formula. Mol Cell Probes. 2013; 27: 60-64.
- Dalkılıç Kaya G.** Süt Ürünleri ve Bebek Mamalarında *Enterobacter Sakazakii (Cronobacter spp.)* Varlığının Araştırılması ve Gelişmesinde Sıcaklık ve Seker Çeşitlerinin Etkisi.

- Demirci Ü, Tekiner İH, Cakmak B, Özpınar H.** Occurrence and molecular characterization of different virulence-associated genes of *Cronobacter sakazakii* isolates from some foods and dust samples. *Cienc Rural*. 2018; 48(8): e20180127.
- Duval S, Tweedie R.** Trim and fill: A simple funnel-plot-based method of testing and adjusting for publication bias in meta-analysis. *Biometrics*. 2000; 56(2): 455-63.
- Friedermann M.** *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). *Int J Food Microbiol*. 2007; 116:1-10.
- Garbowska M, Berthold-Pluta A, Stasiak-Rozanska L.** Microbiological quality of selected spices and herbs including the presence of *Cronobacter* spp. *Food Microbiol*. 2015; 49: 1-5.
- Gökmen M, Tekinşen KK, Gürbüz Ü.** Presence of *Enterobacter sakazakii* in Milk Powder, Whey Powder and White Cheese Produced in Konya. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2010; 16: 163-166.
- Gutema FD, Agga GE, Abdi RD, De Zutter L, Duchateau L, Gabriël S.** Prevalence and Serotype Diversity of *Salmonella* in Apparently Healthy Cattle: Systematic Review and Meta-Analysis of Published Studies. 2000-2017 *Front Vet Sci*. 2019; 6: 102.
- Güner A, Doğruer Y, Cebirbay MA, Yalçın S, Gülsen S, Telli N.** An investigation on the prevalence of *Cronobacter sakazakii* in powdered infant formula consumed in Turkey. *J Food Agri Environ*. 2011; 9(2): 82-84.
- Heperkan D, Dalkilic-Kaya G, Juneja VK.** *Cronobacter sakazakii* in baby foods and baby food ingredients of dairy origin and microbiological profile of positive samples. *LWT-Food Sci Technol*. 2017; 75: 402-407.
- Holy O, Forstythe S.** *Cronobacter* spp. as emerging causes of healthcare-associated infection. *J Hosp Infect*. 2014; 86: 169-177.
- Hu S, Yu Y, Xiao X.** Stress resistance, detection and disinfection of *Cronobacter* spp. in dairy products: A review. *Food Control*. 2018; 85: 400-415.
- Iversen C, Mullane N, McCardell B, Tal BD, Lehner A, Fanning S, Stephan R, Joosten H.** *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter genomospecies* 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov. and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008; 58: 1442-1447.
- Jaradat ZW, Al Mousa W, Elbetieha A, Al Nabulsi A, Tall BD.** *Cronobacter* spp.-opportunistic food-borne pathogens. A review of their virulence and environmental-adaptive traits. *J Med Microbiol*. 2014; 63: 1023-1037.
- Kalyantanda G, Shumyak L, Archibald LK.** *Cronobacter* Species Contamination of Powdered Infant Formula and the Implications for Neonatal Health. *Front Pediatr*. 2015; 3: 56.
- Karataş M.** Tunceli Bölgesinde Satışa Sunulan Geleneksel Şavak Tulum Peynirlerinin *Cronobacter* Spp. Yönünden İncelenmesi, 16s rRNA Dizi Analizi ile Alt Tür Belirlemesi ve Suşların Antibiyotik Dirençliliğinin Saptanması. Yüksek Lisans Tezi, Tunceli Üniversitesi, Tunceli, 2014.
- Kimiran-Erdem A, Arslan-Aydoğdu EÖ, Gürün S.** Bacteriological analysis of the red pepper spices marketed as packaged and unpackaged in Istanbul. *IUFS J Biol*. 2013; 72(2): 23-30.
- Koluman A.** Çeşitli Gıdalardan *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) İzolasyon ve İdentifikasyonu. *GTED*. 2011; 6(2): 16-19.
- Kucerova E, Clifton SW, Xia XQ, Long F, Porwollik S, Fulton L, Fronick C, Minx P, Kyung K, Warren W, Fulton R, Feng D, Wollam A, Bhonagiri SNV, Nash WE, Hallsworth-Pepin K, Wilson RK, McClelland M, Forsythe SJ.** Genome sequence of *Cronobacter sakazakii* BAA-894 and comparative genomic hybridization analysis with other *Cronobacter* species. *PLoS One*. 2010; 5: e9556.
- Li Y, Chen Q, Zhao J, Jiang H, Lu F, Bie X, Lu Z.** Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*. 2014; 37: 109-114.
- Matyar F, Kaya A, Dinçer S.** Antibacterial Agents and Heavy Metal Resistance in Gram-Negative Bacteria Isolated From Seawater, Shrimp And Sediment in Iskenderun Bay, Turkey. *Science of The Total Environ*. 2008; 407: 279-285.
- Menga M.** Toz Bebek Mamalarında ve Yeni Doğan Beslenme Tüplerinde *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, 2011.
- Özçakmak S, Çetinkaya A.** The presence of *Cronobacter sakazakii*, Enterobacteriaceae spp. and Ochratoxin-A in Infant Rice-based formula and milled rice products. *Hitite J Sci Eng*. 2018; 5(2): 85-90.
- Patsopoulos N, Evangelou E., Ioannidis JPA.** Sensitivity of between-study heterogeneity in metaanalysis: proposed metrics and empirical evaluation. *Int J Epidemiol*. 2008; 37(5): 1148-1157.
- Polat Yemiş G.** *Cronobacter sakazakii*'nin Bebek Mamalarından İzolasyonu ve Gelişme Parametrelerinin İncelenmesi. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 2011.
- Sani NA, Odeyemi OA.** Occurrence and prevalence of *Cronobacter* spp. in plant and animal derived food sources: a systematic review and meta-analysis. *Springerplus*. 2015; 4: 545.
- Sezer Ç, Vatanserver L, Bilge N.** The Microbiological Quality of Infant Milk and Follow-on Formula. *Van Vet J*. 2015; 26(1): 31-34.
- Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR.** An illustrated guide to the methods of meta-analysis. *J Eval Clin Pract*. 2001; 7: 135-148.
- Tokatlı N.** Farklı Formülasyonlarda Üretilen Bebek Mamalarının Bileşimi, Bazı Mikrobiyolojik Özellikleri ve *Enterobacter sakazakii* Varlığının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi, Tekirdağ, 2009.
- Van Acker J, de Smet F, Muyldermans G, Bougateg A, Naessens A, Lauwers S.** Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(1): 293-297.

Expression Patterns of Galectin-1 and Galectin-3 in Hibernating Anatolian Ground Squirrel (*Spermophilus Xanthoprimum*) Gastrointestinal Tract

Mehmet ÖZBEK^{1*}, Mustafa ÖZTOP²

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, 15030, Burdur, Turkey

²Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, 15030, Burdur, Turkey

ABSTRACT

Hibernation is a survival adaptation characterized by extended fasting when food is less or unavailable. Prolonged fast may affects various proteins expression including galectins binding β -galactosyl. There is no data on the expression of Galectin-1 and -3 (Gal-1 and -3) during hibernation. This study aimed to examine the expression of Gal-1 and -3 in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) gastrointestinal tract. Intense Gal-1 immunostaining was observed in some cells of both gastric lamina propria and villous connective tissue of the small intestine. In colon and cecum, intense Gal-1 immunoreaction was observed in some connective tissue cells around the crypt epithelium, as well as in the smooth muscles of vessel walls, lamina muscularis and tunica muscularis of all the regions. Gastric foveolar epithelium showed moderate nuclear and intracytoplasmic Gal-3 immunostaining. Moreover, Gal-3 immunostaining was detected in villous epithelial cells of the duodenum and ileum. Intense Gal-3 labeling also was present in all the cryptal surface epithelial cells of the colon and cecum. In conclusion, both Gal-1 and Gal-3 expression in gastrointestinal tract during hibernation was similar to that of non-hibernating species. In the gastrointestinal tract, Gal-1 did not display different expression pattern, whereas Gal-3 expression was more intense in large intestine epithelium.

Keywords: Anatolian ground squirrel, Galectin, Hibernation, *Spermophilus xanthoprimum*

Hibernasyondaki Anadolu Yer Sincabı (*Spermophilus xanthoprimum*) Gastrointestinal Kanalında Galektin-1 ve Galektin-3'ün Ekspresyon Paternleri

ÖZ

Hibernasyon, besinin az olduğu veya hiç olmadığı uzun süreli açlık ile karakterize olan durumlarda hayatta kalma adaptasyonudur. Uzun süreli açlık β -galaktozil bağlayan galektinler de dahil olmak üzere bir çok proteinin ekspresyonunu etkileyebilir. Galektinler, β -galaktozil bağlayan proteinlerdir. Hibernasyonda Galektin-1 ve -3 (Gal-1 ve -3)'ün ekspresyonuna ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu çalışmada hibernasyondaki Anadolu yer sincabı (*Spermophilus xanthoprimum*) gastrointestinal kanalında Gal-1 ve 3'ün ekspresyonunun incelenmesi amaçlanmıştır. Hem gastrik lamina propria hem de ince bağırsağın villöz bağ dokusundaki bazı hücrelerde yoğun Gal-1 immün boyanması gözlemlendi. Gastrointestinal kanalın bütün bölümlerindeki damar duvarları, lamina muskularis ve tunika muskularisindeki düz kaslarda yoğun Gal-1 ekspresyonu gözlemlendi. Ayrıca kolon ve sekumda kript epiteli etrafındaki bazı bağ dokusu hücrelerinde de yoğun Gal-1 immünoreaksiyonu belirlendi. Gastrik foveoler epitel hücreleri orta derecede nükleer ve intrasitoplazmik Gal-3 immün reaksiyon gösterdi. Duodenum ve ileumun villöz epitel hücrelerinde Gal-3 immün boyanması tespit edildi. Ayrıca, kolon ve sekumdaki kriptlerin yüzey epitel hücrelerinde yoğun Gal-3 boyanması görüldü. Sonuç olarak hibernasyon sürecinde gastrointestinal kanaldaki hem Gal-1 hem de Gal-3 ekspresyonu hibernasyona yatmayan türlerle benzerdi. Gastrointestinal kanal bölümlerinde Gal-1 ekspresyonu açısından farklılık gözlenmezken, Gal-3 ekspresyonu diğer gastrointestinal bölümlere nazaran kalın bağırsak epitelinde daha yüküdü.

Anahtar Kelimeler: Anadolu yer sincabı, Galektin, Hibernasyon, *Spermophilus xanthoprimum*

To cite this article: Özbek M, Öztop M. Expression Patterns of Galectin-1 and Galectin-3 in Hibernating Anatolian Ground Squirrel (*Spermophilus Xanthoprimum*) Gastrointestinal Tract. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):77-85.

Submission: 29.12.2019 Accepted: 17.02.2020 Published Online: 23.02.2020

ORCID ID; MÖ: 0000-0002-2274-5359, MÖ: 0000-0002-2923-9280

*Corresponding author e-mail: mehmetozbek2@gmail.com

INTRODUCTION

Galectins, also known as soluble-type lectins, are a family of proteins and bind β -galactosyl-containing glycoconjugates with a high affinity. Fifteen galectins have been discovered in mammals until now and all of them possess a common carbohydrate recognition domain (CRD) (Nio-Kobayash 2017). From the point of view of protein structure, some galectins (Galectin 1 and 2 termed as a prototype) include only one CRD and are found as dimers while other galectins (Galectin 4, 8, and 9) harbor two non-identical CRDs linked with a short linking region (tandem repeat type). Galectin-3 (the chimera type) is distinctive as it is found as a monomer and consists of only one C-terminal CRD co-existed with an N-terminal regulatory domain (Houzelstein et al. 2004). Most of galectins are produced by various cell types and are found in both intracellular and extracellular locations. Intracellular galectins might affect various biological processes and cellular signaling through protein-protein interactions in a way that is independent of their glycan-binding activity (Liu et al. 2002) while extracellular galectins control the activity of cytokines by having an effect on their levels of expression and secretion and by impeding the diffusion of cytokines through the extracellular matrix (Gordon-Alonso et al. 2018). Though binding either bivalently or multivalently to glycoconjugates on cell surfaces and cross-linking with them, galectins could regulate cellular processes such as cytokine secretion, apoptosis, migration and adhesion (Rubinstein et al. 2004). In this respect, galectins have been involved in various cellular functions, including differentiation, activation, regulation and survival of T cells and, therefore, may have key roles in the regulation of chronic inflammatory disorders like inflammatory bowel diseases (IBD) and other autoimmune diseases (Müller et al. 2006). The digestive system of mammals contains a lot of galectins (Nio et al. 2005). Gal-1 and -3 are the most examined members of the galectin family. Surprisingly, Gal-1 is widely expressed in different portions of the mouse and human gastrointestinal system and is involved in some intestinal disorders such as IBD and colorectal cancer (Santucci et al. 2003, Mizoguchi and Mizoguchi 2007, Hokama et al. 2008, Ose et al. 2012). On the other hand, Gal-3 is highly produced by subepithelial macrophages and enterocytes in the gastrointestinal tract (Lotz et al. 1993, Brazowski et al. 2009). Gal-3 is predominately found in giant inclusions at the apical membrane of confluent enterocytes. Gal-3 has been reported to be secreted from a variety of cell types through a nonclassical secretory pathway (Cooper and Barondes 1990, Huflejt et al. 1997, Puthenedam et al. 2011).

Hibernators, including the Anatolian ground squirrels examined here, provide the unique opportunity to investigate what is naturally organ preservation.

Torpor bouts, which are characterized by minimal body temperature and suppressed metabolism (2–4% of euthermic levels), greatly resemble cold periods (2–4°C) used for organ preservation (Green 2000). Although hibernating animals become well acclimatized to harsh winter conditions and tend to rely heavily on these radical changes for survival each year, hibernation could be considered to be stressful to the gastrointestinal tract from various aspects including prolonged hypothermia, extended fasting, redistribution of blood flow and rapid changes in metabolism (Carey et al. 2001). The gastrointestinal immune system exhibits some alterations during hibernation. Indeed, long torpor phase makes gut epithelium leakier, which in turn leads to the passage of many molecules and bacteria in an uncontrolled manner (Kurtz and Carey 2007). The increased permeability may give rise to a hyperactivation of the immune system in hibernating mammals. Although gastrointestinal tract stunningly harbors a higher number of immune cells during hibernation, the mucosal structure seems to escape unscathed from the torpor bouts and there exist no observable signs of pathology (Kurtz and Carey 2007, Sisa et al. 2017). Many studies exist on Gal-1 and -3 expression in gastrointestinal tract of non-hibernating animals (Nio-Kobayash 2017). However, there is a lack of knowledge in their expression in gastrointestinal tract during hibernation. Knowledge of how hibernation influences Gal-1 and 3 expression in the gastrointestinal tract being exposed to various stressful factors might shed new light on gastrointestinal physiology and contribute to success rates of intestinal surgery, including transplantation. For this purpose, we aimed to investigate Gal-1 and -3 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) gastrointestinal tract.

MATERIAL and METHODS

Experimental Design and Ethical Declaration

Animal experiments were conducted in accordance with the guidelines on Animal Care and Use after approval (#15/140) by Local Ethics Committee for Animal Experiments of Erciyes University (HADYEK). Six male Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthoprimum*) were included in the study. Animals' weights were within the range of 300 to 380g. Squirrels were wild captured from steppes with the help of Tomahawk Traps (Model #202) in Develi (Kayseri, Turkey) in August 2016. Thus, their absolute ages are unknown. Squirrels were then transported to the laboratory where they were put in quarantine for about one week in cages with a steady laboratory temperature of 21°C under 12:12 h light-dark cycle conditions until ensuring they had very healthy. Squirrels that would enter hibernation were fed on fresh fruit, sunflower seeds, standard rodent mix and water *ad libitum* until they saved enough quantities of fat before hibernation. Initially, the

ambient temperature was adjusted to $21 \pm 1^\circ\text{C}$ and the artificial photoperiodic conditions (light-dark cycle, 200-0 lux) was adjusted to imitate the external photoperiod. Environment temperature was fallen to 6°C from September 2016 to December 2016. The food substances were taken away from the cages. Lights were turned out to make the transition into torpor easier. When going into the laboratory, a red safe light (3–5 lux) was shut on in order not to frighten torpid squirrels. Three months later, squirrels were anesthetized with intraperitoneal ketamine (88.9 mg/ml) and xylazine (11.1 mg/ml) and euthanized with cardiac puncture (Olson and McCabe 1986). After that, stomach and intestine parts were quickly removed from each animal and dissected. The stomach and intestine samples were fixed in 10% formol-alcohol solution. After histological fixation, the samples were dehydrated in ascending series of ethanol. The tissue samples were then passed through a series of methyl benzoate and benzol. After clearing, the samples were embedded in paraplast for permanent tissue blocks.

Immunohistochemical Analysis

Sections (5 μm in thickness) were obtained from stomach and intestine blocks by employing a rotary microtome (Leica RM2125RT) and collected on poly-L-lysine coated slides. The Labeled Streptavidin–Biotin (LSAB) staining method was performed for immunohistochemical analysis as previously described (Özbek et al. 2018). Slides were deparaffinized with xylene and rehydrated by passing through alcohol series (from 100%, 96%, 80% to 70%). Upon washing with phosphate-buffered saline (PBS), antigen retrieval was performed by heating sections in a citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) within a microwave oven at full power for 20 min to unmask antigenic epitopes. Then, slides were cooled down at room temperature for 20 min, following washing in PBS containing 0,2% Triton X-100 to enhance the membrane permeability. Then, endogenous peroxidase activity was inhibited by incubating in 3% hydrogen peroxide (H_2O_2) in distilled water in a dark humidity chamber. Sections were then rinsed for 15 min in PBS and encircled by a liquid blocker. Non-specific binding was blocked using Ultra V Block. After removed more solution from the sections, slides were treated with anti-Galectin-1 and-3 primary antibodies listed in Table 1 overnight at 4°C . The next day, procedures were resumed. 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC, #TA-125-HA) was added onto slides to demonstrate the resultant signal. The slides were counterstained with Gill's hematoxylin and mounted in a water-based mounting medium (# TA-060-UG). All dilutions were determined according to manufacturer's instructions. The immunohistochemical staining specificity was confirmed through negative and positive controls. Both normal rabbit IgG (non-immune sera, #sc-2027) and PBS were replaced with the primary

antibodies for negative controls. Squirrel testes and epididymis were employed for positive control. Immunohistochemical procedure was repeated three times for each sample to confirm staining reliability.

Semi-quantitative assessment of immunostaining

Immunoreactive sections were assessed using BX51 microscope (Olympus). Photographs were then taken with the help of a digital camera (DP74). We used three sections cut at 50 μm interval for each animal. Four randomly selected areas were examined per section. Immunostaining was evaluated semiquantitatively using an intensity score (IS). The IS of the immunostaining reactivities in the cells was determined independently by the authors. The staining intensity of Gal-1 and Gal-3 in the gastrointestinal tract was examined microscopically at 40, 100, 200 and 400 magnification. Results of IS were presented as 0 (no staining), + (weak staining), ++ (moderate staining) and +++ (intense staining) as previously described (Öztop et al. 2019). Semi-quantitative scoring is summarized in Table 2.

RESULTS

Galectin-1 Staining

We examined all three parts of the stomach, including cardia, fundus and pylorus. In the all three parts, some cells in the lamina propria show intense immunoreaction. We also observed intense labelling in smooth muscle cells of vessel walls, lamina muscularis, and tunica muscularis. In the small intestine, intense immunostaining was detected in some cells of the villous connective tissue while few cells were positive for Gal-1 in submucosa. In the colon and cecum, intense immunoreaction was also observed in some connective tissue cells around crypts epithelium. As in stomach, we detected an intense immunostaining in smooth muscles of vessel walls, lamina muscularis and tunica muscularis (Fig. 1 and 2).

Galectin-3 Staining

Gastric foveolar epithelium showed moderate nuclear and intracytoplasmic immunostaining in all three parts of the stomach, including cardia, fundus and pylorus. In the duodenum and ileum, we observed immunostaining in villous epithelial cells but not in crypt epithelium. Interestingly, some cells in the intestinal villi were not positive for Gal-3. In the colon and cecum, we detected an intense labelling in all surface cells of crypt epithelium but not in cells at bottom of crypts (Fig. 3 and 4).

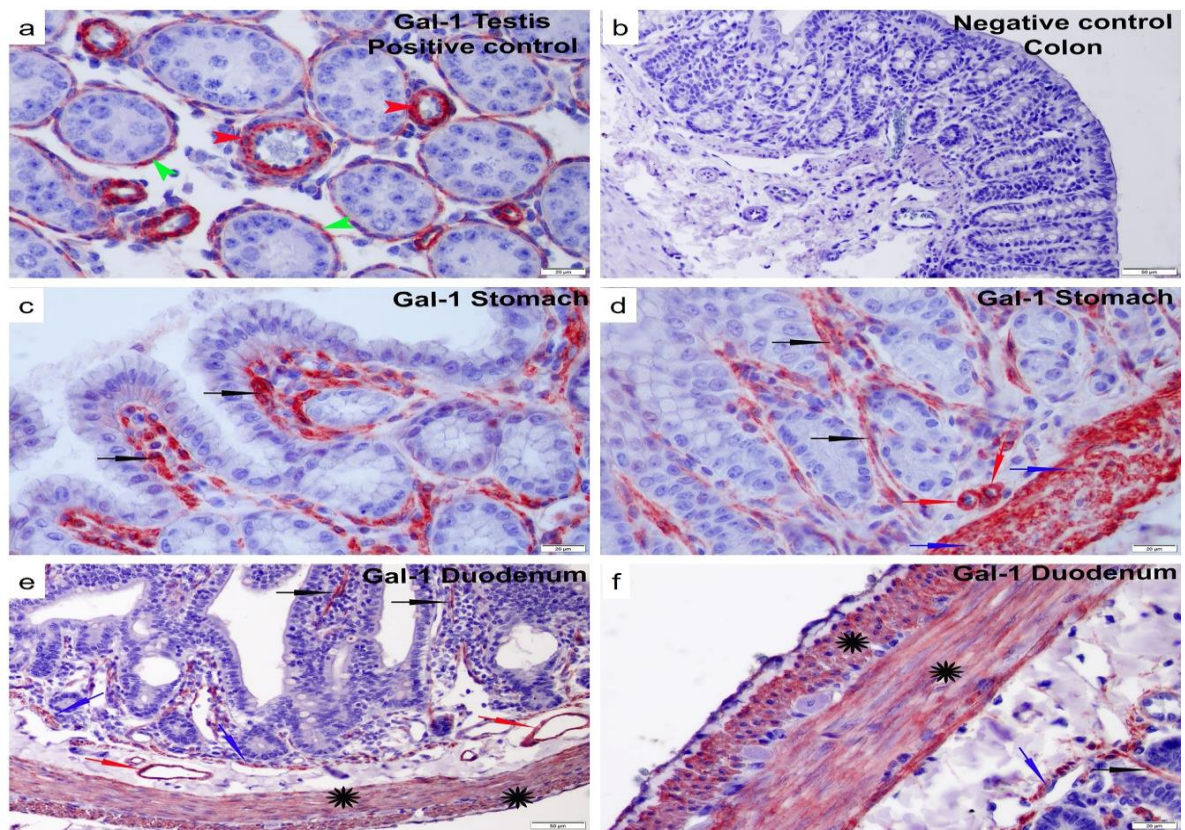


Figure 1. Representative images showing positive control (a), negative control (b) and Gal-1 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) stomach (c, d) and duodenum (e, f). Peritubular myoid cells (green arrowheads) and vessel walls (red arrowheads) showed positive immunostaining in control testis. In stomach and duodenum, intense immunostaining was observed in smooth muscles of vessel walls (red arrows), lamina muscularis (blue arrows), and tunica muscularis (black asterisk). Some cells of lamina propria (black arrows) also were intensely positive for Gal-1. Bars: 50 μ m (b, e) and 20 μ m (a, c, d, f).

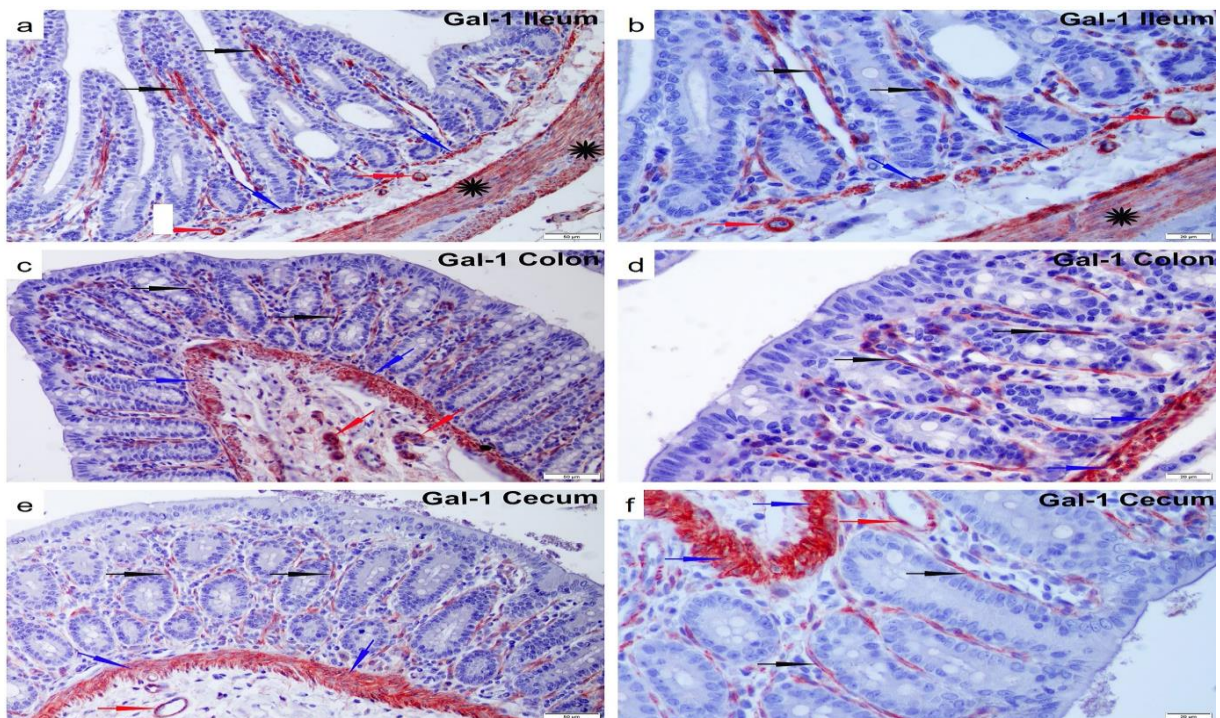


Figure 2. Representative images showing Gal-1 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) ileum (a, b), colon (c, d) and cecum (e, f). Intense immunostaining was observed in smooth muscles of vessel walls (red arrows), lamina muscularis (blue arrows), and tunica muscularis (black asterisk). Intense immunostaining in some cells (black arrows) of lamina propria. Bars: 50 μ m (a, c, e) and 20 μ m (b, d, f).

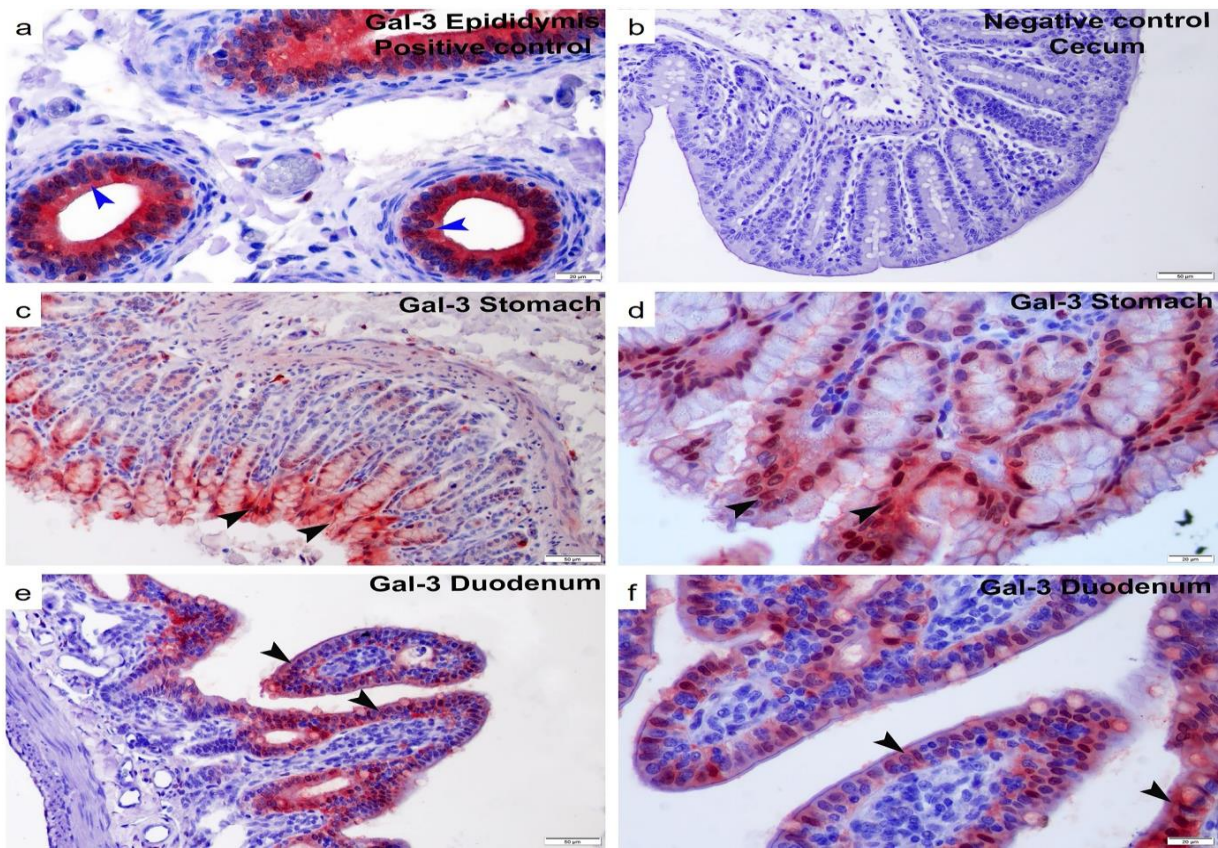


Figure 3. Representative images showing positive control (a), negative control (b) and Gal-3 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthopyrmus*) stomach (c, d) and duodenum (e, f). Epididymal epithelium (blue arrowheads) showed positive immunoreaction in control epididymis. In stomach, moderate nuclear and intracytoplasmic staining were observed in foveolar epithelium (black arrowheads). Some cells of villous epithelium (black arrowheads) were positive for Gal-3 in duodenum. Bars: 50 µm (b, c, e) and 20 µm (a, d, f).

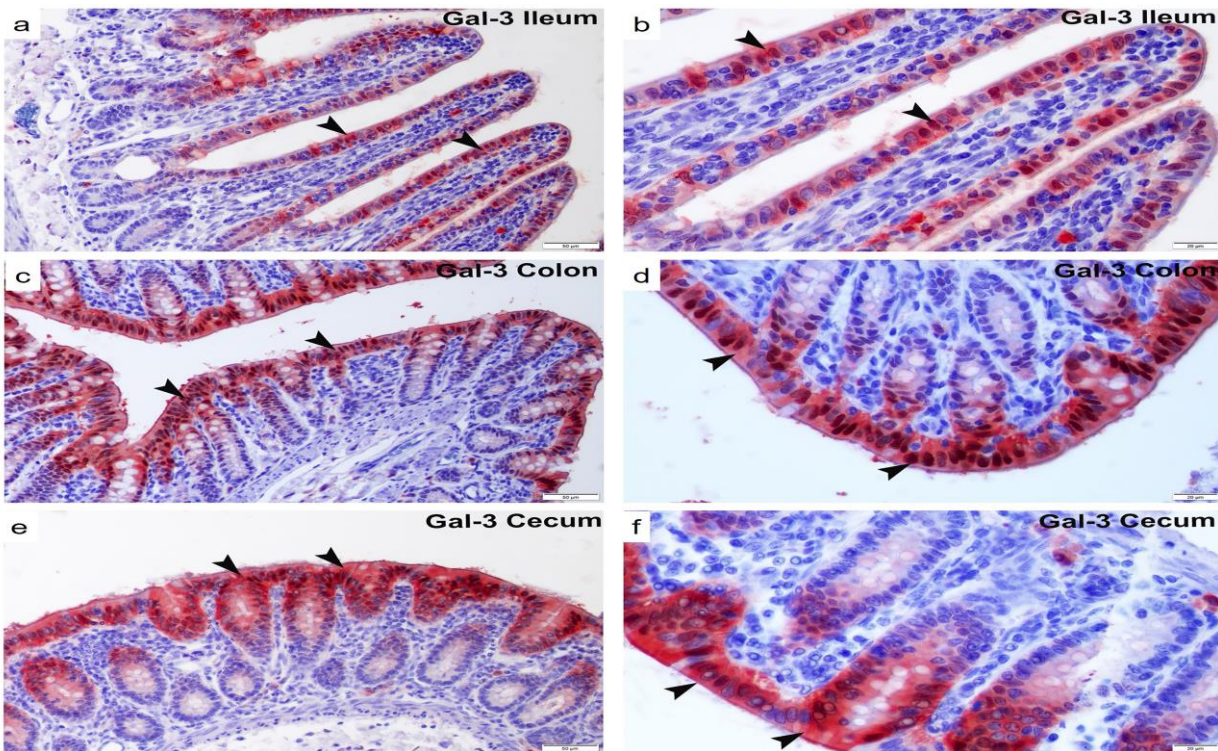


Figure 4. Representative images showing Gal-3 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthopyrmus*) ileum (a, b), colon (c, d) and cecum (e, f). Some cells of villous epithelium (black arrowheads) showed moderate positive immunostaining in ileum. In colon and cecum, intense immunostaining was observed in surface cells (black arrowheads) of crypt epithelium. Bars: 50 µm (a, c, e) and 20 µm (b, d, f).

Table 1. Primary antibodies used for immunohistochemistry (IHC).

Antibody	Clonality	Immunogen	Host	Dilution	Catalogue no*	Reactivity
Gal-1	Polyclonal	Recombinant human galectin 1 consisting of 110 amino acids	Rabbit	1/250	NBP1-89791	Human, mouse, rat
Gal-3	Monoclonal Clone A3A12	Full length recombinant human galectin 3	Mouse	1/300	NB300-538	Human, mouse, rat, rabbit

*All antibodies listed were provided from Novus Biologicals.

Table 2. Semiquantitative evaluation of Galectin-1 and -3 staining in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) gastrointestinal tract.

Tissue	Region	Galectin-1	Galectin-3
Stomach	Foveolar epithelium	-	++/ n, ic
	Some cells in lamina propria	+++/ ic	-
	Smooth muscles of lamina muscularis	+++/ ic	-
	Smooth muscles of tunica muscularis	+++/ ic	-
	Vessel walls	+++/ ic	-
Duodenum	Villous epithelium	-	++/ n, ic
	Some cells in lamina propria	+++/ ic	-
	Smooth muscles of lamina muscularis	+++/ ic	-
	Smooth muscles of tunica muscularis	+++/ ic	-
	Vessel walls	+++/ ic	-
Ileum	Villous epithelium	-	++/ n, ic
	Some cells in lamina propria	+++/ ic	-
	Smooth muscles of lamina muscularis	+++/ ic	-
	Smooth muscles of tunica muscularis	+++/ ic	-
	Vessel walls	+++/ ic	-
Colon	Villous epithelium	-	+++/ n, ic
	Some cells in lamina propria	+++/ ic	-
	Smooth muscles of lamina muscularis	+++/ ic	-
	Smooth muscles tunica muscularis	+++/ ic	-
	Vessel walls	+++/ ic	-
Cecum	Villous epithelium	-	+++/ n, ic
	Some cells in lamina propria	+++/ ic	-
	Smooth muscles of lamina muscularis	+++/ ic	-
	Smooth muscles of tunica muscularis	+++/ ic	-
	Vessel walls	+++/ ic	-

The degree of immunostaining was determined as either negative (-), weak (+), moderate (++) or intense (+++) by two independent observers (MÖ, MÖ), as previously described (Öztop et al., 2019). n: nuclear staining, ic: intracytoplasmic staining.

DISCUSSION

Here, we report an immunohistochemical analysis of Gal-1 and -3 expression in hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*) gastrointestinal tract. The present study clearly showed that Gal-1 and -3 were expressed in all gastrointestinal tract during hibernation.

It has been showed that Gal-1 expression was at low levels in many tissues, but abundant particularly in cardiac, skeletal and smooth muscle cells (Catt et al. 1987, Wasano et al. 1990, Barondes et al. 1994). In

addition, Gal-1 is constitutively expressed in vascular smooth muscle cells (VSMCs) and has been regarded as a constituent of the vascular extracellular matrix (Barondes 1984, Moiseeva et al. 1999). Previous studies have indicated that recombinant Gal-1 protein improved VSMC proliferation and regulated the spreading, migration and attachment of VSMCs (Moiseeva et al. 1999, Moiseeva et al. 2000). Gal-1 also regulates vascular constriction through controlling the surface expression of Cav1.2 channel in VSMCS (Wang et al. 2011). Furthermore, Gal-1 deficiency affects remodeling and vasocontractile response in hypoxia-induced pulmonary hypertension

in animals (Case et al. 2007). In the present study, we observed Gal-1 expression in smooth muscle cells of lamina muscularis, tunica muscularis and vessel walls in the gastrointestinal tract as in non-hibernating animals. Considering previous studies, we suggest that Gal-1 plays a key role in the maintenance of vascular homeostasis in hibernation as in non-hibernating period. However, we could not spot any difference in Gal-1 expression in smooth muscle cells in all the examined regions using the immunohistochemical analysis. Quantitative analysis should be used to determine the effect of hibernation on Gal-1 expression in smooth muscle cells in the gastrointestinal tract.

Gal-1 also has a role in immune responses of gastrointestinal tract to microbial infection, especially regarding macrophage and T cell responses as well, but can be made up for to maintain normal colonization and infection resolution. Gal-1 binds to N-glycans of proteins CD7, CD43 and CD45 on the surface of activated T cells. This results in segregation of these proteins into membrane microdomains and triggering of apoptosis (Barondes et al. 1994, Camby et al. 2006). The deficiency in Gal-1 led to a decrease in the T cell influx into the lamina propria as infection had occurred. Furthermore, mice deficient in Gal-1 had a limited number of macrophages in the lamina propria before developing infection and failed to evoke a macrophage response to infection at the time point being considered at least (Curciarello et al. 2014). Kaltner et al. (2002) detected Gal-1 expression in fibroblast in lamina propria of bovine duodenum and colon but not in epithelial cells. However, some researcher observed Gal-1 expression in colonic epithelial cells (Santucci et al. 2003). In our study, Gal-1 expression was found in some cells of lamina propria as in non-hibernating animals. These cells may be fibroblast, based on previous study (Kaltner et al. 2002). Gal-1 positive cells in lamina propria may be involved in mucosal immune system homeostasis during hibernation as in non-hibernating animals. We think that the differences among studies (Santucci et al. 2003) may be due to methodological error or use of poor-quality primary antibody.

Gal-3 suppresses apoptosis in vitro via a cell death inhibition pathway involving Bcl-2 (Yang et al. 1996). Reports on mice indicated that mouse duodenal and colonic epithelium exhibited a nuclear and intracytoplasmic Gal-3 expression (Brassart et al. 1992). Furthermore, other researchers reported Gal-3 expression in stomach, ileum and colon epithelium (Demetter et al. 2008) and in bovine duodenum and colon epithelium (Kaltner et al. 2002). Gal-3 has also been detected in various types of tumor cells both in vivo (Woo et al. 2001, Takenaka et al. 2003) and in vitro (Cebo et al. 2002). In addition, Gal-3 mRNA was detected by an intensified expression on the luminal side of the intestinal and gastric mucosa in

mice (Sanjuán et al. 1997). Moreover, another researcher reported that Gal-3 mainly localized at the myosin-rich terminal web of fully matured epithelial cells at the villus intestinalis tips. In addition, the apical localization of Gal-3 also was detected in T84 cells and polarizing epithelial cell lines (Lindstedt et al. 1993, Huflejt et al. 1997). Delacour et al. (2006) showed that intracellular sorting and correct targeting of glycoproteins to the apical plasma membrane were dependent on Gal-3. This has been supported with the finding that, in Gal-3 knockout mice, villin and actin abundant in the brush border become abnormally spread over baso-lateral membranes (Delacour et al. 2008). Moreover, interaction of Gal-3 with cytokeratins (Goletz et al. 1997), actin (Joubert et al. 1992), and possibly tubulin (Ozaki et al. 2004) has been described. Consistent with non-hibernating animals, we detected a nuclear and intracytoplasmic Gal-3 expression in epithelial cells at top of foveola gastrica, intestinal villi and the top of large intestine crypt. Gastric and small intestinal epithelium showed moderate immunoreaction while large intestine epithelium demonstrated intense immunostaining. This may be due to actin, myosin or intermediate filament contents of epithelial cells, as described in previous study. Interestingly, some cells in the intestinal villi were not positive for Gal-3. These cells may undergo apoptosis during hibernation. In addition, we also suggest that Gal-3 may act to prevent luminal epithelial cells of the gastrointestinal mucosa from cell death.

In conclusion, this is the first study that describes Gal-1 and -3 expression in the gastrointestinal tract of hibernating Anatolian ground squirrel (*Spermophilus xanthoprimum*). While Gal-1 expression was detected in smooth muscle cells and some cells of lamina propria, Gal-3 expression was determined in luminal cells of gastrointestinal mucosa. Both Gal-1 and Gal-3 expression in gastrointestinal tract was similar to that of other species using immunohistochemical analysis. Gal-1 expression was not different in the gastrointestinal tract, whereas Gal-3 expression was more intense in the large intestine epithelium. Further studies are required to investigate possible roles of galectins during hibernation.

ACKNOWLEDGEMENT

➤ *Local Ethics Committee for Animal Experiments of Erciyes University (15/140)*

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DN, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, et al. Galectins: a family of animal

beta-galactoside-binding lectins. *Cell*. 1994; 76(4): 597-598.

- Barondes SH.** Soluble lectins: a new class of extracellular proteins. *Science*. 1984; 223(4642): 1259-1264.
- Brassart D, Kolodziejczyk E, Granato D, Woltz A, Pavillard M, Perotti F, Frigeri LG, Liu FT, Borel Y, Neeser JR.** An intestinal galactose-specific lectin mediates the binding of murine IgE to mouse intestinal epithelial cells. *Eur J Biochem*. 1992; 203: 393-399.
- Brazowski E, Dotan I, Tulchinsky H, Filip I, Eisenthal A.** Galectin-3 expression in pouchitis in patients with ulcerative colitis who underwent ileal pouch-anal anastomosis (IPAA). *Pathol Res Pract*. 2009; 205: 551-558.
- Camby I, Le Mercier M, Lefranc F, Kiss R.** Galectin-1: a small protein with major functions. *Glycobiology*. 2006; 16(11): 137R-157R.
- Carey HV, Mangino MJ, Southard JH.** Changes in gut function during hibernation: implications for bowel transplantation and surgery. *Gut*. 2001; 49(4): 459-461.
- Case D, Irwin D, Ivester C, Harral J, Morris K, Imamura M, Roedersheimer M, Patterson A, Carr M, Hagen M, Saavedra M, Crossno J Jr, Young KA, Dempsey EC, Poirier F, West J, Majka S.** Mice deficient in galectin-1 exhibit attenuated physiological responses to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292(1): L154-164.
- Catt JW, Harrison FL, Carleton JS.** Distribution of an endogenous beta-galactoside-specific lectin during foetal and neonatal rabbit development. *J Cell Sci*. 1987; 87: 623-633.
- Cebo C, Vergoten G, Zanetta JP.** Lectin activities of cytokines: functions and putative carbohydrate-recognition domains. *Biochim Biophys Acta*. 2002; 1572(2-3): 422-434.
- Cooper DN, Barondes SH.** Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol*. 1990; 110: 1681-1691.
- Curciarello R, Steele A, Cooper D, MacDonald TT, Kruidenier L, Kudo T.** The role of Galectin-1 and Galectin-3 in the mucosal immune response to *Citrobacter rodentium* infection. *PLoS One*. 2014; 9(9): e107933.
- Delacour D, Cramm-Behrens CI, Drobecq H, Le Bivic A, Naim HY, Jacob R.** Requirement for galectin-3 in apical protein sorting. *Curr Biol*. 2006; 16(4): 408-414.
- Delacour D, Koch A, Ackermann W, Eude-Le Parco I, Elsässer HP, Poirier F, Jacob R.** Loss of galectin-3 impairs membrane polarisation of mouse enterocytes in vivo. *J Cell Sci*. 2008; 121: 458-465.
- Demetter P, Nagy N, Martin B, Mathieu A, Dumont P, Decaestecker C, Salmon IJ.** The galectin family and digestive disease. *Pathol*. 2008; 215(1): 1-12.
- Goletz S, Hanisch FG, Karsten U.** Novel alphaGalNAc containing glycans on cytokeratins are recognized invitro by galectins with type II carbohydrate recognition domains. *J Cell Sci*. 1997; 110: 1585-1596.
- Gordon-Alonso M, Bruger AM, Bruggen P.** Extracellular galectins as controllers of cytokines in hematological cancer. *Blood*. 2018; 132(5): 484-491.
- Green C.** Mammalian hibernation: lessons for organ preparation? *Cryo Letters*. 2000; 21(2): 91-98.
- Hokama A, Mizoguchi E, Mizoguchi A.** Roles of galectins in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14: 5133-5137.
- Houzelstein D, Gonçalves IR, Fadden AJ, Sidhu SS, Cooper DN, Drickamer K, Leffler H, Poirier F.** Phylogenetic analysis of the vertebrate galectin family. *Mol Biol Evol*. 2004; 21(7): 1177-1187.
- Huflejt ME, Jordan ET, Gitt MA, Barondes SH, Leffler H.** Strikingly different localization of galectin-3 and galectin-4 in human colon adenocarcinoma T84 cells. Galectin-4 is localized at sites of cell adhesion. *J Biol Chem*. 1997; 272: 14294-14303.
- Joubert R, Caron M, Avellana-Adalid V, Mornet D, Bladier D.** Human brain lectin: a soluble lectin that binds actin. *J Neurochem*. 1992; 58(1): 200-203.
- Kaltner H, Seyrek K, Heck A, Sinowatz F, Gabius HJ.** Galectin-1 and galectin-3 in fetal development of bovine respiratory and digestive tracts. Comparison of cell type-specific expression profiles and subcellular localization. *Cell Tissue Res*. 2002; 307(1): 35-46.
- Kurtz CC, Carey HV.** Seasonal changes in the intestinal immune system of hibernating ground squirrels. *Dev Comp Immunol*. 2007; 31: 415-428.
- Lindstedt R, Apodaca G, Barondes SH, Mostov KE, Leffler H.** Apical secretion of a cytosolic protein by Madin-Darby canine kidney cells. Evidence for polarized release of an endogenous lectin by a nonclassical secretory pathway. *J Biol Chem*. 1993; 268(16): 11750-11757.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL.** Intracellular functions of galectins. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 263-273.
- Lotz MM, Andrews CW Jr, Korzelius CA, Lee EC, Steele GD Jr, Clarke A, Mercurio AM.** Decreased expression of Mac-2 (carbohydrate binding protein 35) and loss of its nuclear localization are associated with the neoplastic progression of colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90: 3466-3470.
- Mizoguchi E, Mizoguchi A.** Is the sugar always sweet in intestinal inflammation? *Immunol Res*. 2007; 37: 47-60.
- Moiseeva EP, Javed Q, Spring EL, de Bono DP.** Galectin 1 is involved in vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res*. 2000; 45(2): 493-502.
- Moiseeva EP, Spring EL, Baron JH, de Bono DP.** Galectin 1 modulates attachment, spreading and migration of cultured vascular smooth muscle cells via interactions with cellular receptors and components of extracellular matrix. *J Vasc Res*. 1999; 36(1): 47-58.
- Müller S, Schaffer T, Flogerzi B, Fleetwood A, Weimann R, Schoepfer AM, Seibold F.** Galectin-3 modulates T cell activity and is reduced in the inflamed intestinal epithelium in IBD. *Inflamm Bowel Dis*. 2006; 12(7): 588-597.
- Nio J, Kon Y, Iwanaga T.** Differential cellular expression of galectin family mRNAs in the epithelial cells of the mouse digestive tract. *J Histochem Cytochem*. 2005; 53(11): 1323-1334.
- Nio-Kobayashi, J.** Tissue- and cell-specific localization of galectins, β -galactose-binding animal lectins, and their potential functions in health and disease. *Anat Sci Int*. 2017; 92(1): 25-36.
- Ose R, Oharaa O, Nagase T.** Galectin-1 and Galectin-3 mediate protocadherin-24-dependent membrane localization of β -catenin in colon cancer cell line HCT116. *Curr Chem Genomics*. 2012; 6: 18-26.
- Olson ME, McCabe K.** Anesthesia in the Richardson's ground squirrel: comparison of ketamine, ketamine and xylazine, droperidol and fentanyl, and sodium pentobarbital. *J Am Vet Med Assoc*. 1986; 189: 1035-1037.

- Ozaki K, Inoue K, Sato H, Iida A, Ohnishi Y, Sekine A, Sato H, Odashiro K, Nobuyoshi M, Hori M, Nakamura Y, Tanaka T.** Functional variation in LGALS2 confers risk of myocardial infarction and regulates lymphotoxin-alpha secretion in vitro. *Nature*. 2004; 429: 72-75.
- Özbek M, Hitit M, Yıldırım N, Özgenç Ö, Ergün E, Ergün L, Beyaz F, Kurtdede N, Altunay H.** Expression pattern of galectin-1 and galectin-3 in rat testes and epididymis during postnatal development. *Acta Histochem*. 2018; 120(8): 814-827.
- Öztop M, Özbek M, Liman N, Beyaz F, Ergün E, Ergün L.** Localization profiles of natriuretic peptides in hearts of pre-hibernating and hibernating Anatolian ground squirrels (*Spermophilus xanthopyrmus*). *Vet Res Commun*. 2019; 43(2): 45-65.
- Puthenedam M, Wu F, Shetye A, Michaels A, Rhee KJ, Kwon JH.** Matrilysin-1 (MMP7) cleaves galectin-3 and inhibits wound healing in intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*. 2011; 17(1): 260-267.
- Rubinstein N, Ilarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA.** The role of galectins in the initiation, amplification and resolution of the inflammatory response. *Tissue Antigens*. 2004; 64(1): 1-12.
- Sanjuán X, Fernández PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A, Campo E.** Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology*. 1997; 113(6): 1906-1915.
- Santucci L, Fiorucci S, Rubinstein N, Mencarelli A, Palazzetti B, Federici B, Rabinovich GA, Morelli A.** Galectin-1 suppresses experimental colitis in mice. *Gastroenterology*. 2003; 124: 1381-1394.
- Sisa C, Turrone S, Amici R, Brigidi P, Candela M, Cerri M.** Potential role of the gut microbiota in synthetic torpor and therapeutic hypothermia. *World J Gastroenterol*. 2017; 23(3): 406-413.
- Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T.** Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin -3. *Cancer Lett*. 2003; 195(1): 111-119.
- Wang J, Thio SS, Yang SS, Yu D, Yu CY, Wong YP, Liao P, Li S, Soong TW.** Splice variant specific modulation of CaV1.2 calcium channel by galectin-1 regulates arterial constriction. *Circ Res*. 2011; 109(11): 1250-1258.
- Wasano K, Hirakawa Y, Yamamoto T.** Immunohistochemical localization of 14 kDa beta-galactoside-binding lectin in various organs of rat. *Cell Tissue Res*. 1990; 259(1): 43-49.
- Woo HJ, Joo HG, Song SW, Sohn YS, Chae C.** Immunohistochemical detection of galectin-3 in canine gastric carcinomas. *J Comp Pathol*. 2001; 124(2-3): 216-218.
- Yang RY, Hsu DK, Liu FT.** Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93(13): 6737-6742.

Caspases Activities in TNF- α Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell

Burcu Menekşe BALKAN^{1*}, Öğünç MERAL², Görkem KISMALI², Deniz TURAN³, Tevhide SEL²

¹Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 15030, Burdur, Turkey

²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 06110, Ankara, Turkey

³Republic of Turkey, Ministry of Agriculture and Forestry, İzmir Bornova Veterinary Control Institute, 35010, İzmir, Turkey

ABSTRACT

Purpose: Tumor necrosis factor (TNF) plays a key role in cellular events such as cell survival, proliferation, differentiation, inflammation, immunity, and apoptosis. Although named Tumor necrosis factor for its tumor cytotoxicity, TNF has been implicated in a wide spectrum of other diseases. The aim of the present study is to determine the effects of TNF- α on caspase 3, 9, and 1 enzyme activities in HepG2 cells. Materials and methods: Hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was used and cells were cultured in the absence (control) or presence of TNF- α for 24 h. The effect of TNF- α on caspase 3, caspase 9, and caspase 1 enzyme activities in hepatocarcinoma cells were examined in TNF- α treated and control cells using colorimetric assay kits. Results: There were significant increases in caspases 1 and 3 levels in TNF- α treated HepG2 cells compare to control cells. Conclusions: TNF- α is a pro-inflammatory cytokine, secreted by inflammatory cells. This mechanism may be involved in inflammation-associated carcinogenesis. TNF could act both as tumor promoter, and cancer killer. Presented findings suggest that caspases-dependent cell death occurs in TNF- α applied HepG2 cells.

Keywords: HepG2, Cancer, Caspases, TNF- α

TNF- α Uygulanan HepG2 Hepatoselüler Karsinoma Hücrelerinde Kaspaz Aktiviteleri

ÖZ

Amaç: Tümör nekroz faktörü (TNF), hücre sağkalımı, proliferasyon, farklılaşma, inflamasyon, bağışıklık ve apoptoz gibi hücrel olaylarda anahtar rol oynar. Tümör sitotoksitesindeki etkisinden dolayı Tümör nekroz faktörü olarak adlandırılmasına rağmen, TNF geniş bir yelpazede birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Çalışmada, hepatoselüler karsinoma hücrelerinde TNF- α 'nın kaspaz 1, 3 ve 9 enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini belirlemek amaçlanmıştır. Materyal ve metod: Çalışmada TNF- α uygulanmayan (kontrol) ve 24 saat boyunca TNF- α uygulanan hepatoselüler karsinoma hücre hattı HepG2 hücreleri kullanılmıştır. TNF- α 'nın kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri kolorimetrik olarak ticari kit ile gerçekleştirilmiştir. Bulgular: TNF- α uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 ve kaspaz 3 enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlenmiştir ($p < 0,05$). Sonuç: TNF- α inflamatuvar hücreler tarafından salınan pro-inflamatuvar bir sitokindir. Bu mekanizma, yangıya bağlı şekillenen karsinogenezde rol oynayabilir. TNF, hem tümör oluşumunu destekleyebilir hem de kanser hücrelerini öldürücü etki gösterebilir. Sunulan bulgular, TNF- α uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz bağımlı hücre ölümünün meydana geldiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: HepG2, Kanser, Kaspaz, TNF- α

To cite this article: Balkan B.M, Meral Ö, Kısmalı G, Turan D, Sel T. Caspases Activities in TNF- α Applied HepG2 Hepatocellular Carcinoma Cell. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):86-91.

Submission: 04.11.2019 Accepted: 21.02.2020 Published Online: 29.02.2020

ORCID ID; BMB: 0000-0002-0206-6455, ÖM: 0000-0001-8813-4991, GK: 0000-0003-3414-4697,

TS: 0000-0002-9753-779X, DT: 0000-0003-3248-1032

*Corresponding author e-mail: burcualpaslan@yahoo.com

GİRİŞ

Kanserde tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde oluşum mekanizmalarının aydınlatılması önem taşımaktadır. İnflamasyon süreci kanser oluşumunda önemli rol oynar. Kanser oluşumu ve inflamasyon süreci arasındaki ilişkinin gösterilmesinin ardından (Mantovani ve ark. 2008, Mauer ve ark. 2015) bu konu ile ilgili çalışmalar artmıştır. İmmün sistem dokularda meydana gelen hasara karşı inflamasyon yanıtının oluşmasını sağlar. Tümör oluşum sürecinde immün yanıt ile tümör baskılanabilir, ya da bazı durumlarda inflamasyon tümör gelişiminde artış da meydana getirebilmektedir (Mantovani ve Pierotti 2008). İnflamasyona bağlı gelişen kanser sürecinde tümör nekroz faktör-alfa gibi moleküller bulunmaktadır (Dranoff 2004). 157 amino asitten oluşan Tümör Nekroz Faktörü (TNF, TNF- α olarak da anılır), memeli canlılarda bağışıklık ve hücreyel homeostazda merkezi rolleri olan en yoğun incelenen pro-enflamatuar sitokinlerden biridir (Silke ve Hartland 2013) ve hücre sağ kalımı, proliferasyon, farklılaşma, inflamasyon, bağışıklık ve apoptoz gibi birçok hücreyel olaylarda anahtar rol oynar (Aggarwal 2003, Brenner ve ark. 2015). Epidemiyolojik ve klinik çalışmalar, kronik inflamasyonun tümör gelişimini ve ilerlemesini arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Pro-enflamatuar sitokin olan TNF, inflamasyon ve karsinogenez arasında bir köprü kuran endojen bir tümör promotörü olarak hareket edebilir. Gerçekten de, çalışma sonuçları TNF'nin aşağıda özetlendiği gibi karsinogenezde hücreyel dönüşüm, hayatta kalma, proliferasyon, anjiyogenez ve metastaz gibi süreçlerde rol aldığını göstermiştir. TNF- α 'nın kanser hücresi ölümünü indüklemekteki özelliği, bunun potansiyel bir kanser terapötik olmasını sağlar (Wang ve Lin 2008).

Apoptotik süreçte önemli rol oynayan kaspazlar, sistein-proteaz grubu enzimlerdendir. İnaktif proteinler olarak sentezlenirler. Çeşitli yollarla aktive edilirler ve substratlarını bir aspartat kalıntısının karboksil ucundan ayırırlar. Kaspazların aktivasyonu hücre ölümünde birçok hücreyel ve morfolojik değişimlerin meydana gelmesine neden olur (Nicholson 1999). Kaspazlar farklı moleküler özelliklere sahiptirler ve buna göre farklı gruplarda sınıflandırılır. Apoptozdaki (kaspaz-3, -6,-7, -8 ve -9 memelilerde), ve yangıdaki (kaspaz-1, -4, -5, -12 insanlarda ve kaspaz -1, -11 ve -12 farelerde) rollerine göre iki ana sınıfa ayrılırlar. Apoptoz mekanizmasındaki rollerine göre ise başlatıcı kaspazlar (kaspaz-8 ve -9) ya da sonlandırıcı kaspazlar (kaspaz-3, -6 ve -7) olarak iki sınıfa ayrılırlar (McIlwain ve ark. 2013). Kaspazlar apoptoz için çok önemli olduğundan, hatalı kaspaz aktivasyonu ve sonuçta ortaya çıkan yetersiz hücre ölümü, tümör oluşumunu hızlandırabilir, mutasyona uğramış hücrelerin kalıcılığına yardımcı olabilir ve tümör oluşumunu destekleyebilir (McIlwain ve ark. 2013).

TNF- α 'nın kanser hücresi üzerinde farklı etkiler yapabileceği çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak TNF- α 'nın HepG2 hücre hatlarında kaspaz aktiviteleri üzerine etkilerinin incelendiği çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada, TNF- α ilavesinin hepatocelüler karsinoma hücrelerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla, hücre ölümünde önemli rol oynayan ve çeşitli yollarla aktive edildiklerinde hücre ölümünde birçok hücreyel ve morfolojik değişimlerin meydana gelmesinde rol oynayan kaspaz enzim aktivitelerindeki değişim ölçülmesi amaçlanmıştır. Bu hücrelerde TNF- α 'nın yangısal ve hücre ölümü süresinde etkilerini gösterebilmek amacıyla, yangı ilişkili kaspazlardan kaspaz-1, başlatıcı kaspazlardan özellikle mitokondriyal yolda aktivitesi artan kaspaz-9 ve hücre ölümünün geri dönüşümsüz basamağını gösteren ve sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz-3 aktivitelerinin ölçülmesi hedeflenmiştir.

MATERYAL ve METOT

HepG2 hepatocelüler karsinoma hücre hattı (American Type Culture Collection, ATCC Cat No. HB- 8065) hücreleri çalışma materyali olarak kullanılmıştır. Hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ varlığında hücre kültürü inkübatöründe üretilmiştir. Kontrol grubu ve çalışma grubu olarak iki grup oluşturulmuştur. Kontrol grubu hücrelere % 10 Fetal Dana Serum (FBS), 300 mg/l L-glutamin, 50 mg/l Gentamisin sülfat içeren RPMI 1640 Medium (Sigma-Aldrich) besi yeri eklenmiştir. Çalışma grubuna ise kontrol grubuna uygulanan aynı içerikli besi yeri içine 1µg/ml TNF- α ilave edilmiştir.

Kullanılan TNF- α dozu MTT hücre canlılık testi ile belirlenmiştir. MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) hücre canlılık testi 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirildi. Hücreler 96 kuyucuklu mikropalkanın her kuyucuğunda 100.000 hücre/kuyucuk olacak şekilde ekildi. Bu hücreler 37 °C'de, %5 CO₂'li inkübatörde çoğaltıldı. Hücreler 24 saat süresince farklı dozlarda TNF- α uygulandı. Uygulama sonrasında her bir kuyucuğa MTT eklendi ve 4 saat 37 °C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda bütün kuyucuklara % 10'luk SDS çözeltisi eklendi ve 12 saat inkübe edildi. Hücrelerin canlılık ölçümü spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda yapıldı. MTT hücre canlılık testi sonucu inkübasyon süresi 24 saat ve uygulanacak TNF- α dozu 1 mikrogram/ml olarak belirlenmiş ve analizler bu şartlarda gerçekleştirilmiştir.

TNF- α içeren (çalışma grubu) ve TNF- α içermeyen (kontrol grubu) besi yeri hücrelere ilave edilerek, 24 saat beklendikten sonra her iki grupta da kaspaz 1 (cat no:K111), kaspaz 3 (cat no: K106) ve kaspaz 9 (cat no:K119) enzim aktiviteleri "BioVision kaspaz colorimetric assay" kitleri ile ölçülmüştür. Her bir

analiz için üç ayrı tekrar yapılarak ortalama değerler alınmıştır.

Çalışma grubu ve kontrol grubunda ölçülen kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktiviteleri arasındaki farklılığın belirlenmesi için, istatistiksel analizlerde Mann-Whitney U testi kullanılmış ve $p < 0,05$ düzeyi anlamlı olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kontrol grubunda ölçülen enzim aktiviteleri ve çalışma grubunda ölçülen enzim aktiviteleri kontrol grubuna göre % değişim olarak hesaplanmıştır (Tablo 1). TNF- α uygulanan çalışma grubu HepG2 hücrelerinde kaspaz 1 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre yaklaşık olarak 2 kat artmıştır. Kontrol grubu kaspaz 3 enzim aktivitesi %100 olarak alındığında çalışma grubunda kaspaz 3 enzim aktivitesi kontrol grubuna göre %174 olarak tespit edilmiştir. Çalışma grubunda kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitelerindeki bu artışlar TNF- α uygulanmayan kontrol grubuna göre istatistik olarak anlamlı bulunurken ($p < 0,05$) (Şekil 1 ve 2), kaspaz 9 aktivasyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelmemiştir (Şekil 3).

Yapılan çalışmaların çoğu TNF- α 'nın tümör oluşumunu desteklediğini göstermesine rağmen, TNF- α bazı deney sistemlerinde anti-onkojenik etki gösterdiği de bildirilmiştir (Lin ve Karin 2007). Bizim çalışmamızda da kontrol grubuna kıyasla çalışma grubunda kaspaz 3 enzim aktivitesinde ölçülen anlamlı artış, TNF- α 'nın HepG2 hücre hatlarında hücre ölümünü arttırdığını göstermesi Lin ve Karin (2007)'in bildirdiği çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Farklı kanser hastalarında serum TNF- α konsantrasyonu artmış ve meme ve prostat kanseri hastalarında kemoterapi sırasında belirgin şekilde azalmıştır (Ahmed ve ark. 2001, Ferrajoli ve ark. 2002). TNF- α ekspresyonu ayrıca çeşitli pre-neoplastik ve tümör dokularında daha yüksek seviyelerde eksprese edilmiştir. Bu artış kronik lenfositik lösemi, Barrett'in adenokarsinomu, prostat kanseri, meme kanseri ve servikal karsinom gibi malign hastalıkların ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur (Ahmed ve ark. 2001, Ferrajoli ve ark. 2002). Bu hastalarda mevcut durumda TNF- α düzeylerinde ya da ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiş, ancak HepG2 hücre hatlarında TNF- α ilavesinin hücre canlılığı üzerine etkileri incelenmemiştir. TNF- α uygulamasının yapıldığı Wang ve ark. (2005)'nin yaptıkları çalışmada TNF- α uygulamasının kornea epitel hücre hatlarına hücre sağ kalımını desteklediğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak hücre sağ kalımını arttırması farklı hücre hattında uygulanmasına bağlı olabilir (Wang ve ark. 2005).

McIlwain ve ark. (2016), kaspazların kesilmesinin, yangısal sürecin ilk 2 günü boyunca önemli ölçüde arttığını ve sonrasında hücre sağ kalımını sağlayan proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını bildirmiştir (McIlwain ve ark. 2016). Çalışmamızda da kaspaz 1 ve 3 enzim aktivitelerinin ikisinde meydana gelen artış, TNF- α uygulamasının HepG2 hücrelerinde yangısal süreçle birlikte hücre ölümüne neden olmasından dolayı olabilir.

Tümör nekroz faktör- α 'nın (TNF- α) fare osteoblast MC3T3-E1 hücrelerinde apoptoz ve otofajideki rolünün araştırıldığı çalışmada, TNF- α , osteoblastlarda hem otofaji hem de apoptozu indüklediği bildirilmiştir. TNF- α 'nın osteoblastlarda bölünmüş kaspaz-3 ekspresyonunun arttırarak hücre apoptozunu indüklediğini ortaya koymuşlardır (Zheng ve ark. 2017). Bu çalışma sonuçları da kaspaz-3 aktivitesinin artması bakımından çalışmamızla benzerlik göstermiştir.

Çalışmamızda TNF- α 'nın HepG2 hücre hatlarında hücre ölümünü arttırması, TNF- α 'nın kanser tedavisinde kullanım potansiyelini göstermektedir. Josephs ve ark. (2018), yayınladıkları derlemede TNF- α 'nın immünolojik olarak temel bir molekül olduğunu, kanser immunoterapisinde kullanılabileceğini, ancak bunun solubl reseptörlerin uzaklaştırılması ve endojen TNF- α aktivitesinin arttırılması ile mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

TNF- α 'nın kronik inflamasyondaki bildirilen rolüne rağmen, TNF - / - fareleri, yabani tip farelere kıyasla 3'-metilkolantren (MCA) ile indüklenen deri sarkomasına karşı daha duyarlı olduğu ve bu da, TNF- α 'nın konakçısı MCA-indüklenen sarkom oluşumuna karşı koruduğunu düşündürmektedir (Swann ve ark. 2008). Ksenografli glioma fare modelinde TNF'nin benzer etkisi gözlenmiştir (Villeneuve ve ark. 2005, Nakagawa ve ark. 2007) TNF'nin antitümör rolü, tümör oluşumunu engelleyen, örneğin sitotoksik T lenfosit (CTL) veya tümör infiltrate edici makrofajlar ile tümör stroma yıkımını teşvik eden ve tümör infiltrate edici dendritik hücreleri (DC'ler) aktive eden, böylece tümöre yol açan güçlü adaptif bir bağışıklık yanıtını tetikleyen immün cevapla ilişkili olabilir (Dace ve ark.2007, Nakagawa ve ark. 2007, Zhang ve ark. 2008).

TNFR-1, -2 veya her ikisi de negatif olan gen knock out farelerde, konakçı doğal bağışıklık hücrelerinde eksprese edilen TNFR-2'nin TNF- α 'nın antitümör etkisine aracılık etmesi yeterli bulunmuştur.

TNF- α 'nın pro- veya anti-tümörögenез rollerindeki farklılıklar organlardaki, hücre bağlamında ve karsinojenlerdeki farklılıklara bağlanabilir. Örneğin, TNF- α ile indüklenen NF- κ B aktivitesi farklı rejenerasyon hızlarına sahip organlarda (yani, yavaş rejeneratif kolonda pro-tumoriyenik iken hızlı

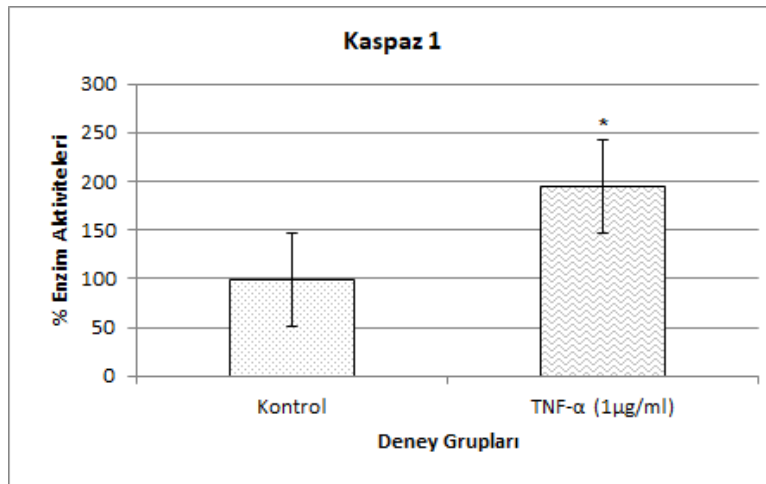
rejeneratif karaciğerde anti-tümörjenik) çelişkili etkilere sahiptir (Karin ve ark. 2006). Sunulan çalışmada kullanılan HepG2 hücre hattında hücre ölümünü arttırıcı etki göstermesinin nedeni bu hücrelerde rejenerasyon hızının fazla olması olabilir.

Kaspazlar apoptotik hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok hücrel ve morfolojik değişimlere yol açan enzimlerdir. TNF- α ve Fas Ligand de novo RNA veya protein sentezi olmadan bir proteolitik sinyalleme kaskadıyla hücre ölümünü tetikleyebilir (Boldin ve ark. 1996, Cleveland ve Ihle 1995). Bu sebeple, yapılan çalışmada TNF- α ilave edilen çalışma grubunda özellikle bir hücrenin apoptotik ölüm sürecinde olduğunu gösteren, sonlandırıcı kaspazlardan olan kaspaz 3'ün aktivitesinin kontrole göre artışı, TNF- α ilavesinin bu hücrelerde apoptotik hücre ölümünü tetiklediğini düşündürülebilir.

TNF-a / FasL ile indüklenen apoptozdaki anahtar oyuncular, kaspaz 1 olarak adlandırılan interlökin-1b

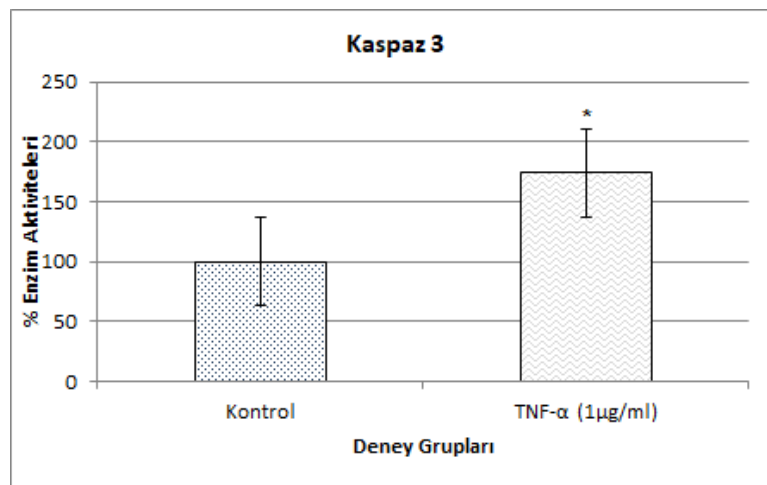
dönüştürücü enzim (ICE) ailesinin üyeleridir (Alnemri ve ark. 1996). Memeli ICE proteaz ailesinin en az 10 üyesi vardır ve bunlar Caenorhabditis elegans programlanmış hücre ölüm geni ced-3'ün homologlarıdır (Yuan ve ark. 1993). Bu farklı ICE ailesi üyelerinin farklı apoptoz yollarında işlev görebilmeleri mümkündür.

Kaspaz 1, çeşitli yollardan kaynaklanan apoptozda rol oynar. Kaspaz 1 gen ekspresyonu (Miura ve ark. 1993) veya sitokin indüksiyonu (Chin ve ark. 1997) ile hücrelerde yüksek ICE ekspresyonu hücre ölümüne yol açabilir. STAT Sinyal yolunun sktivasyonu kaspaz 1 ekspresyonuna ve apoptozu neden olabilir (Chin ve ark. 1997). Chin ve ark. (1997) A549 hücre hatlarında ve Alvarez ve ark. (2013) insan nöroblastom hücre hattında yaptıkları çalışmalar ile benzer olarak, HepG2 hücre hatlarında yapılan sunulan çalışmamızda da TNF- α ilavesi kaspaz 1 enzim aktivitesinde artış meydana getirmiştir.



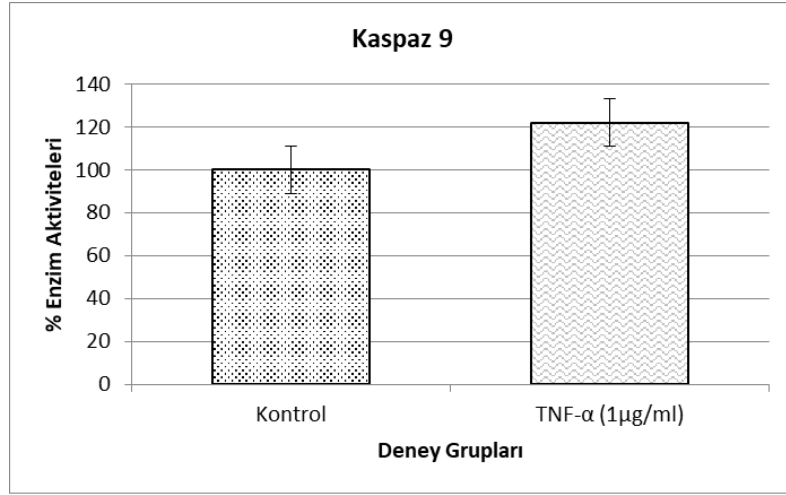
Şekil 1. 1 μ g/ml TNF- α uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 1 değişimi

Figure 1. Changes in caspase 1 compared to control in 1 μ g/ml TNF- α treated HepG2 cells



Şekil 2. 1 μ g/ml TNF- α uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 3 değişimi

Figure 2. Changes in caspase 3 compared to control in 1 μ g/ml TNF- α treated HepG2 cells



Şekil 3. 1µg/ml TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde kontrole göre kaspaz 9 değişimi

Figure 3. Changes in caspase 9 compared to control in 1µg/ml TNF-α treated HepG2 cells

Tablo 1. 1µg/ml TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde kaspaz 1, kaspaz 3 ve kaspaz 9 enzim aktivitelerinin kontrole göre değişimleri

Table 1. Changes in caspase 1, 3, and 9 enzyme activities in 1µg/ml TNF-α applied HepG2 cells compare to control cells

Kaspaz	Kontrol grubu	Çalışma grubu	
Kaspaz 1	% 100	% 197	p<0,05
Kaspaz 3	% 100	% 174	p<0,05
Kaspaz 9	% 100	% 122	

SONUÇ

Çalışmada elde edilen veriler TNF-α ilavesinin HepG2 hücrelerine ölüme neden olabildiğini gösteren veriler sunmaktadır. Kaspaz aile üyeleri, hücre ölümü ve inflamasyonu kontrol eden kritik düzenleyici ağların merkezindedir. Kaspazlarla ilişkili uzun hastalık listesi, kaspazların uygunsuz aktivasyonunun ve kontrol ettikleri hücre ölümünün ve inflamatuvar yolların düzensizliğinin insan sağlığı için doğrudan sonuçlara sahip olduğunu gösterir. Kaspaz 3 enzim aktivitelerindeki artış, TNF-α uygulanan HepG2 hücrelerinde meydana gelen hücre ölümünün kaspaz bağımlı ve kaspaz 1 enzim aktivitesindeki artış ise yangısal süreçle ilgili olabileceğini göstermektedir. Kaspaz 9 enzim aktivitesinde meydana gelen istatistik olarak anlamlı olmayan artış ise, apoptotik süreçte kaspaz aktivasyonunun bir kaskad şeklinde farklı sürelerde artabileceğinden dolayı olabilir.

Ayrıca bu sonuçlar TNF-α'nın HepG2 hücreleri üzerinde hücre ölümü üzerine etkilerinin araştırılması ya da tedavide kullanılabilirliğinin belirlenmesi için planlanacak diğer çalışmalara ışık tutacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 1.Uluslararası Veteriner Biyokimyası ve Klinik Biyokimya Kongresi'nde sunuldu. Hatay, Türkiye, Nisan 2018.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Aggarwal BB.** Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(9): 745-56.
- Ahmed MI, Salahy EE, Fayed ST, El-Hefnawy NG, Khalifa A.** Human papillomavirus infection among Egyptian females with cervical carcinoma: relationship to spontaneous apoptosis and TNF alpha. *Clin Biochem.* 2001; 34(6): 491-8.
- Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J.** Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 1996; 87(2): 171.
- Álvarez S, Muñoz-Fernández MÁ.** TNF-Α may mediate inflammasome activation in the absence of bacterial infection in more than one way. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71477.

- Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D.** Involvement of MACH1, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; 85(6): 803-15.
- Brenner D, Blaser H, Mak T.** Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*. 2015; 15(6): 362-374.
- Chin YE, Kitagawa M, Kuida K, Flavell RA, Fu XY.** Activation of the STAT Signaling Pathway Can Cause Expression of Caspase 1 and Apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*. 1997; 17(9): 5328-5337.
- Cleveland JL, Ihle JN.** Contenders in FasL/TNF death signaling. *Cell*. 1995; 81(4):479-82.
- Dace DS, Chen PW, Niederkorn JY.** CD8+ T cells circumvent immune privilege in the eye and mediate intraocular tumor rejection by a TNF-alpha-dependent mechanism. *J Immunol*. 2007; 178(10): 6115-22.
- Dranoff G.** Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(1): 11-22.
- Ferrajoli A, Keating MJ, Manshoury T, Giles FJ, Dey A, Estrov Z et al.** The clinical significance of tumor necrosis factor-alpha plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002; 100(4): 1215-9.
- Josephs SF, Ichim TE, Prince SM, Kesari S, Marincola FM, Escobedo AR, Jafri A.** Unleashing endogenous TNF-alpha as a cancer immunotherapeutic. *J Transl Med*. 2018; 16(1): 242.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V.** Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*. 2006; 124(4): 823-35.
- Lin WW, Karin M.** A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117(5): 1175-83.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F.** Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008; 454(7203): 436-44.
- Mantovani A, Pierotti MA.** Cancer and inflammation: a complex relationship. *Cancer Lett*. 2008; 267(2): 180-1.
- Mauer J, Denson JL, Bruning JC.** Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends Immunol*, 2015; 36(2): 92-101.
- McIlwain DR, Berger T, Mak TW.** Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013, 5(4): a008656.
- McIlwain DW, Zoetemelk M, Myers JD, Edwards MT, Snider BM, Jerde TJ.** Coordinated induction of cell survival signaling in the inflamed microenvironment of the prostate. *Prostate*. 2016; 76(8): 722-734.
- Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J.** Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell*. 1993; 75: 653-660.
- Nakagawa J, Saio M, Tamakawa N, Suwa T, Frey AB, Nonaka K et al.** TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol*. 2007; 30(4): 803-11.
- Nakagawa J1, Saio M, Tamakawa N, Suwa T, Frey AB, Nonaka K, Umemura N, Imai H, Ouyang GF, Ohe N, Yano H, Yoshimura S, Iwama T, Takami T.** TNF expressed by tumor-associated macrophages, but not microglia, can eliminate glioma. *Int J Oncol*. 2007; 30(4): 803-11.
- Nicholson DW.** Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999; 6(11): 1028-42.
- Silke J, Hartland EL.** Masters, marionettes and modulators: intersection of pathogen virulence factors and mammalian death receptor signaling. *Curr Opin Immunol*. 2013; 25(4): 436-40.
- Swann JB, Vesely MD, Silva A, Sharkey J, Akira S, Schreiber RD, Smyth MJ.** Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2008; 105(2): 652-6.
- Villeneuve J, Tremblay P, Vallieres L.** Tumor necrosis factor reduces brain tumor growth by enhancing macrophage recruitment and microcyst formation. *Cancer Res*. 2005; 65(9): 3928-36.
- Wang L, Reinach P, Lu L.** TNF-alpha promotes cell survival through stimulation of K+ channel and NFkappaB activity in corneal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 2005; 311(1):39-48.
- Wang X, Lin Y.** Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes? *Acta Pharmacol Sin*. 2008; 29(11): 1275-1288.
- Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM, Horvitz HR. The C. elegans cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell*. 1993; 75(4): 641-52.**
- Zhang B, Karrison T, Rowley DA, Schreiber H.** IFN-gamma- and TNF-dependent bystander eradication of antigen-loss variants in established mouse cancers. *J Clin Invest*. 2008; 118(4): 1398-404.
- Zheng L, Wang W, Ni J, Mao X, Song D, Liu T, Wei J, Zhou H.** Role of autophagy in tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of osteoblast cells. *J Investig Med*. 2017; 65(6): 1014-1020.

The Effects of Suckling and Artificially Providing Colostrum (Varying Amount) on The Passive Immunity of Newborn Calves

Mehmet DÜZER¹, Abuzer ACAR^{1*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Diseases, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

Calves need to be healthy for herd progression in sustainable cattle management. Adequately feeding the calves with good quality colostrum is reportedly one of the most important factors affecting their health, growth, immune system, and vitality. Here, we randomly selected new-born calves, purchased from Afyon Ballıpınar Simental Company, regardless of their sex and divided them equally into separate groups. They were categorized ensuring that the parity of cows in the groups was balanced. We included 27 calves (15 females and 12 males) in this study. The animals were categorized as follows: Group 1: calves that consumed the colostrum directly from the udder; Group 2: Calves that consumed the colostrum (approximately 5% of their birth weight) with a feeding bottle; and Group 3: Calves that consumed the colostrum (nearly 8% of their birth weight) through the feeding bottle. It is important to immediately administer the colostrum to the calves after their birth while maintaining hygiene. The feeding method or amount can be selected after considering the infrastructure and facilities of the company. Controlling the immunoglobulin levels with a refractometer may lead to inconclusive results. Considering this, the most accurate method to identify the immunoglobulins is ELISA. Therefore, our results revealed that the calf-deaths associated with colostrum failure could be minimized by producing refractometers suitable for practical use or ready-made diagnostic kits that provide results that are as reliable as ELISA.

Keywords: Colostrum, Refractometer, Immunoglobulin, ELISA, Calf

Yeni Doğan Buzağların Kolostrumu Emerek ve Suni Yollarla Değişik Oranlarda Verilmesinin Pasif İmmunite Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

ÖZ

Sürdürülebilir nitelikteki sığır işletmelerinde sürü devamlılığı bakımından buzağların sağlıklı olması çok önemlidir. Buzağların çok iyi nitelikte kolostrumla yeterli miktarda beslenebilmesi; buzağının sağlığı, gelişimi, immun sistemi ve yaşama gücü üzerindeki en önemli faktör olarak gösterilmektedir. Sunulan bu çalışmada hayvan materyalini yeni doğmuş simental ırkı buzağlar oluşturmaktadır. Hayvanlar, Afyon Ballıpınar Simental İşletmesinin damızlık hayvanlarından doğan buzağlardan cinsiyet ayrımı yapılmaksızın rastgele seçildi ve gruplara dengeli olarak dağıtıldı. Gruplardaki annelerin laktasyon sayısının dengeli olmasına dikkat edildi. Çalışmada 15 dişi 12 erkek olmak üzere toplam 27 buzağı kullanıldı. Grup 1: Annesini direkt olarak memesinden emen buzağlar, Grup 2: Doğum ağırlığının %5'i kadar kolostrumu biberon ile emen buzağlar, Grup 3: Doğum ağırlığının %8'i kadar kolostrumu biberon ile emen buzağlar olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Doğum sonrası en hijyenik ve çabuk şekilde buzağının kolostrum alması sağlanmalıdır. Buradaki yöntem ya da miktar işletmenin alt yapısı ve olanaklarına göre seçilebilir. Refraktometre ile lg seviyesinin kontrolü yanıltıcı sonuçlar verebilir. Bu nedenle en doğru yol ELISA ile immunoglobulin tayinidir. Bu nedenle, araştırmamızdan elde edilen sonuçlar ışığında, gelişen teknoloji ile birlikte daha hassas ölçüm yapabilen, pratik kullanıma uygun refraktometrelerin ya da ELISA kadar güvenilir sonuçlar veren hazır tanı kitlerinin üretilmesi ile kolostrum yetmezliğine bağlı buzağı kayıplarının en aza indirilebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Kolostrum, Refraktometre, Immunoglobulin, ELISA, Buzağı

To cite this article: Düzzer M, Acar A. The Effects of Suckling and Artificially Providing Colostrum (Varying Amount) on The Passive Immunity of Newborn Calves. Kocatepe Vet J. (2020) 13(1):92-97.

Submission: 31.01.2020 Accepted: 27.02.2020 Published Online: 29.02.2020

ORCID ID; MD: 0000-0002-8959-5658, AA: 0000-0002-4235-2763

*Corresponding author e-mail: abuzeracar@hotmail.com

INTRODUCTION

Calf health is imperative for herd continuity in sustainable cattle farms. Adequately feeding the calves with high quality colostrum is reportedly considered to be one of the most important factors affecting their health, growth, immune system, and vitality. Global calf mortality rate is 20%, even in developed countries in terms of animal husbandry. This could be primarily attributed to insufficient and incorrect feeding techniques. However, previous research shows that the mortality rate in calves can be reduced to 3-5% with good care-feeding and colostrum management. Accordingly, colostrum is regarded as a unique nutrient in terms of reducing health problems and minimizing calf losses (Özen 1999).

Colostrum, is necessary to ensure the survival of newborn calves, it is extremely nutritious and is rich in energy, vitamins, minerals, and immunoglobulins (Ig) that are essential for the calves' growth and development. The ratio of dry matter in milk (12%) is considerably lower than that in colostrum (22%), and this difference is largely due to the presence of immunoglobulins in the latter. The immunoglobulins neutralize the pathogenic bacteria that cause diarrhea (Selk 2003). Additionally, colostrum is a laxative that stimulates the normal function of the digestive system (Wattiaux 2014). Furthermore, it is an excellent source of energy as it is rich in animal fat and carbohydrates and is responsible for regulating the body temperature. It also contains trypsin inhibitors and protein structures that accelerate the absorption of Ig and prevents their destruction in the intestine (Selk 2003, Quigley et al. 2009). Although the colostrum is generally thought to be produced between the 6th -10th milking after birth, the true colostrum is obtained in the first milking. It is called "transitional milk" since the milk structure and consistency appears to transform from colostrum to milk from the second milking to the eighth (Wattiaux 2014). Colostrum becomes milk in transit for approximately 48 h, and normal milk in 72 hours (Şenturk 2012).

A healthy immune system is necessary to resist diseases; however, this system cannot provide complete protection to the new-born calves against diseases. Feeding colostrum to new-born calves is imperative since the immunoglobulins that are absorbed via the small intestine create a passive immunity against infections (Korhonen et al. 2000, Hamilton and Giesen 2003, Morter 2003). A serum Ig concentration of ≥ 10 mg/mL indicated the presence of adequate passive immunity (Waterman 1998). This can be ensured by administering the calves with 100 g of IgG in the first 12 hours. Calves should not be allowed to suckle immediately after birth (Hurley and McCoy 2003), since it may result in high rates of passive transfer insufficiency (Weaver et al 2000).

Reportedly, the ideal method to administer colostrum is using a (measured) bottle in a controlled manner. In addition, we can use this method to calculate the amount of colostrum consumed by the calf. Colostrum can be administered to calves with probe application; however, this method may lower the serum IgG levels considering the fact that probe-administered-colostrum first enters the rumen and is absorbed in the abomasum and subsequently the intestines. However, it takes 2-4 hours to transfer the colostrum from the rumen, resulting in lower levels of Ig in the intestines (Quigley and Drewry 1998).

This study aimed to compare the immunoglobulin levels of calves that drank the colostrum directly from the mother in their first two meals, those drinking 5% of the birth weight through a bottle, and those drinking 8% of the birth weight in a bottle. Additionally, we aimed to identify the most efficient and beneficial method for breeders, to guide them in revising or changing their current methods, and to be beneficial in our efforts to cause a nation-wide reduction in calf mortality.

MATERIALS and METHODS

We used 27 new-born Simmental breed calves (15 females and 12 males). We ensured that the lactation number of the mothers in the groups was balanced and the mothers in the mean 3rd lactation were included in the study. The breeding cows underwent a standard dry period feeding and vaccination program. The new-born calves were dried by either being licked by their mothers or using a clean towel. We examined their abdomen and recorded their birth weights. The colostrum brix refractometer values of the calves' mothers were recorded. Concurrently, we stored some of these colostrum samples at -20 °C for ELISA analysis. The official ear tags of the calves were attached on the day they were born. The calves were housed in the same maternity and calf paddock and were fed with calf feed in the form of 2-day-old mixture of water and pellets.

Experimental Design

Three different experimental groups were created by randomly selecting the calves. **Group I (n=6):** Calves were encouraged to drink from the udder and were helped by the staff to suckle after being licked and dried by their mother. The calves started suckling approximately 30 minutes after birth and were permitted to suckle and stop voluntarily. After 10 hours, the calves that had stopped sucking voluntarily were taken to a separate calf compartment and were placed closer to their mother's udder for a second meal. The calf continued to suckle to satiation. In the 3rd and subsequent meals, 2.5 l milk was given to the calf with a nursing bottle, which changed to milk replacement food after the 6th meal.

Group II (n=10): We measured the calves' birth weight and fed them their mother's milk by weighing equal to 5% of their birth weights in feeding bottles. The calves started suckling nearly 30 minutes after birth. Subsequently, they were separated from their mothers and taken to a different room. Approximately 10 h later, we collected the mother's milk equal to 5% of the calves' birth weight and fed the calves with a feeding bottle for their second meal. In the 3rd and subsequent meals, 2.5 l milk was given to the calf with a nursing bottle, which was changed to a milk replacement feed after the 6th meal.

Group III (n=11): We fed the calves in this group with feeding bottles by weighing out their mother's milk equal to 8% of the calf's birth weight. The calves started suckling 30 minutes after birth. The calves were then placed in a separate room. Approximately 10 h later we fed the calves with an identical quantity of their mothers' milk with a feeding bottle for their second meal. In the 3rd and subsequent meals, 2.5 l milk was given to the calf with a nursing bottle, which was changed to milk replacement food after the 6th meal.

Samples and Measurements

Blood IgG levels were determined by collecting the serum, obtained by centrifuging the blood from V. jugularis (1500 cycles, 10 minutes) 24 h after birth and on the 7th day after birth when the calves no longer suckle or drink from the feeding bottle. The blood was stored at -20 °C for ELISA analysis.

We recorded the colostrum brix refractometer values of the calves' mothers, while concurrently freezing these samples at -20 °C for ELISA analysis. Frozen blood serum and colostrum were delivered to the laboratory in the cold chain after completing the sampling. The samples were then analyzed with a Biotek elx800 device using the ELISA method and the Biox branded IgG kit according to the manufacturer's protocol. The calves' body weights were measured and recorded when they were 30 days of age.

Statistical Analyses

Descriptive statistics (Frequency, Percentage, Arithmetic Mean, and Standard Deviation) were used in the study, and the presence of inter-group differences was tested with Single Factor Variance Analysis. The data obtained in the study were analyzed with SPSS 18.01 for Windows package program and studied with a significance level of 0.05. Pearson correlation analysis was performed to determine whether there was a relationship between refractometer measurement results of colostrum samples and immunoglobulin levels in the colostrum determined by ELISA.

RESULTS

Birth weights were recorded for all experimental groups. Accordingly, the calf with the lightest and the heaviest calves at birth weighed 36 kg and 54 kg, respectively. The lowest and highest values with regard to the colostrum IgG levels were 30.37 mg/mL and 85.15 mg/mL, respectively. The lowest value for the calves' blood serum immunoglobulin levels was 1.48 mg/mL and the highest was 8.77 mg/mL. At 1 day of age, the lowest blood serum IgG level was 30.58 mg/mL and the highest was 86.85 mg/mL. The lowest recorded IgG level in the blood serum was 27.66 mg/mL and the highest value was 76.18 mg/mL on the 7th day. The calves were weighed on the 7th day, and the lowest and highest body weights were 38 kg and 58 kg, respectively. On their 30th day, the lowest body weight was 39 kg and the highest was 63 kg; furthermore, we measured the daily body weight gains of the calves at that age, with the lowest being -0.200 kg and highest 0.500 kg (Table 1, 2).

The results of the refractometer measurements of the colostrum samples did not demonstrate any significant correlation with that of the immunoglobulin levels in the colostrum determined by ELISA (Table 3).

Table 1. The descriptive statistics of weight and colostrum measurements in calves

Variables	Unit	Minimum	Maximum	Mean	Standard deviation
Birth weight	Kg	36.00	54.00	43.59	5.44
Colostrum Ig levels	mg/ml	30.37	85.15	64.56	13.39
Calf postpartum Ig levels	mg/ml	1.48	8.77	2.25	1.50
Ig levels at 1 day of age	mg/ml	30.58	86.85	69.37	12.19
Ig levels at 7 days of age	mg/ml	27.66	76.18	62.83	12.07
Body weight at 7 days of age	kg	38.00	58.00	45.85	5.52
Body weight at 30 days of age	kg	39.00	63.00	51	5.62
Daily body weight gain at 30 days of age	kg	0.20	0.50	0.13	0.13

Table 2. The comparison of groups according to weight and colostrum measurements

Variables	Groups	Mean	Standard deviation	Standard error	P value
Birth weight	Group 1	45.83	5.49	2.24	0.27
	Group 2	44.40	5.13	1.62	
	Group 3	41.64	5.52	1.66	
Colostrum	Group 1	74.21	9.29	3.79	0.10
	Group 2	59.79	16.51	5.22	
	Group 3	63.63	9.92	2.99	
Blood sample on birth day	Group 1	3.24	2.88	1.18	0.17
	Group 2	2.17	0.90	0.28	
	Group 3	1.80	0.43	0.13	
Blood sample on day 1	Group 1	65.92	18.80	7.67	0.75
	Group 2	70.62	11.35	3.59	
	Group 3	70.11	9.18	2.77	
Blood sample on day 7	Group 1	60.72	16.40	6.70	0.22
	Group 2	58.78	13.32	4.21	
	Group 3	67.67	6.30	1.90	
Weight on day 7	Group 1	48.50	4.68	1.91	0.31
	Group 2	46.10	5.32	1.68	
	Group 3	44.18	5.96	1.80	
Weight on day 30	Group 1	54.00	5.29	2.16	0.34
	Group 2	50.30	4.55	1.44	
	Group 3	50.00	6.53	1.97	
Daily body weight gain	Group 1	0.27	0.05	0.02	0.27
	Group 2	0.19	0.10	0.03	
	Group 3	0.28	0.18	0.05	

Table 3. Correlation of colostrum IgG levels between refractometer and ELISA analyses

Variables		Refractometer	Colostrum IgG level
Refractometer	Pearson Correlation	1	0.195
	P		0.329
	N	27	27
Colostrum IgG level	Pearson Correlation	0.195	1
	P	0.329	
	N	27	27

DISCUSSION

Calves are born hypogammaglobulinemic due to considerably low amount of immunoglobulins that are transferred from the placenta in ruminants. For this reason, calves must consume colostrum within the first 2 hours after birth to transfer the maternal passive antibodies and build the calf's immune system. Passive transfer failure occurs in calves that have not consumed adequate amount of colostrum, and calves become resistant to diseases (Şentürk 2012). According to Weaver et al. (2000), the calf should not be allowed to suckle immediately after birth. High rates of passive transfer failure reportedly occur in calves that are allowed to suckle their

mother. Here, we did not observe passive transfer insufficiency for approximately 30 min after the calves were cleaned and dried. Considering the results of our study, we could not observe passive transfer failure in calves in Group 1 possibly due to the fact that the calf may have been resting, getting over birth stress, and recovering metabolically for 30 min after birth, and thus getting enough colostrum. However, despite the lack of inter-group statistical differences, the lowest IgG level was determined in Group 1. Therefore, it may be possible to acquire more precise results by increasing the number of animals used in the study.

Besser et al. (1991) investigated three different methods of administering colostrum in Holstein calves, which included feeding the colostrum with a probe, feeding colostrum with bottles, and directly sucking it from the mother were compared, and passive transfer failure rates were revealed. Consequently, the passive transfer failure was found in 10.8% of those fed by the probe, 19.3% of those who were fed a bottle, and 61.4% of those who suckled their mothers. According to our study, passive transfer failure (less than 10 mg/mL of serum immunoglobulin density) was not observed between the groups.

Laestander (2016) compared the methods to administer colostrum, which includes feeding with a bottle, probe, and suckling the mother. In this study, the calves were monitored for 2 weeks, and their feed intake, growth rate, and health status were recorded. In addition, IgG concentrations were measured in the colostrum of the mothers and in the calf blood at the 24th and 48th hour after birth through ELISA. The results revealed no significant difference between the different feeding methods in terms of serum IgG levels at the 24th h and 48th h or calf health. Similarly, we found no significant inter-group differences in terms of IgG level in blood serum taken 24 h after delivery ($P > 0.05$). According to the results of the research conducted by Besser et al. (1991), the passive transfer failure rates were found to be 61%, 19%, and 64% and 15% in calves that suckled their mother, bottle, and administering 2 l with a catheter and 4 L with a catheter, respectively. According to our study, no significant inter-group differences were observed in terms of passive transfer failure ($P > 0.05$). Recording the daily body weight increases revealed a minor inter-group difference specifically in the calves in Group 2. Calves in the Groups 1 and 3 presented with an identical increase in the daily live weight (mean=0.27 for group 1 and 0.28 for group 3), while Group 2 calves had lower daily live weight increase (Mean=19). However, this numerical difference was not statistically significant ($P > 0.05$).

A Brix refractometer is an instrument developed to measure the amount of IgG in the colostrum. The scale (measure) in the Brix refractometer was designed to measure the amount of sucrose in a solution; however, the Brix values could be associated with the Ig in the colostrum. There is a reportedly 0.63 correlation between laboratory analysis results obtained for IgG using radial immunodiffusion and Brix refractometer values. A Brix value of 22% in the scale corresponds to 50 mg/mL, that the colostrum measured is of a high quality. The colostrometer measures the specific gravity of the colostrum and evaluates the total gamma globulin level based on a statistical relationship. It is widely used to determine IgG concentrations in colostrum (Quigly 2009). According to Deelen et al. (2014), a refractometer

control can be used to detect a digital Brix refractometer in detecting maternal immunoglobulin compared to measuring serum total protein. The percentage of Brix demonstrated significant correlations with the IgG levels. No significant relationship was found between refractometer results and serum immunoglobulin results ($P > 0.05$). Accordingly, using a refractometer to estimate the colostrum immunoglobulin level may cause inaccurate evaluation.

Despite the absence of statistically significant inter-group differences, the blood IgG levels of the 1st group calves were thought to be numerically lower than the other groups, along with the presence of a significant difference that could be observed with increase in the number of animals. While our study presented different results with the study of Besser et al. (1991), our study yielded results consistent with those of Laestander (2016) and Weaver et al. (2000).

Therefore, calf colostrum should be obtained immediately after birth, while maintaining a certain degree of hygiene. The method or amount can be selected according to the infrastructure and capability of the farm. Checking the Ig level with a refractometer may give misleading results. Therefore, accuracy can be ensured by using the ELISA method. It is not surprising that this method is not practical and suitable for use in field conditions. Thus, from the perspective of the results obtained from our research, it was concluded that the calf losses due to colostrum insufficiency can be minimized by producing refractometers suitable for practical use or ready-made diagnostic kits that provide results as reliable as ELISA results.

ACKNOWLEDGEMENT

➤ *This study is summarized from the Master's thesis of the first author.*

➤ *This study was supported by Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit. (Project No: 18.KARİYER. 252).*

➤ *The study was approved by the Afyon Kocatepe University Local Animal Ethical Committee (26.06.2018/108-18).*

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Besser TE, Gay CC, Pritchett L.** Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1991;198(3):419-22.
- Deelen SM, Ollivett TL, Haines DM, Leslie KE.** Evaluation of a Brix refractometer to estimate serum immunoglobulin G concentration in neonatal dairy

calves. *J Dairy Sci.* 2014; 97:3838–3844. DOI: 10.3168/jds.2014-7939

Hamilton T, Giesen L. Effect of colostrum quality and management on immunity transfer of beef calves. <http://131.104.112.18/beefupdate/Article94/a-effect-of-colostrum-quality-and-htm>. 2003.

Hurley WL, McCoy G. Supplementing low and medium quality colostrum with dried serum. <http://traill.outreach.uiuc.edu/>. 2003.

Korhonen H, Marnila P, Gill HS. Milk immunoglobulins and complement factors. *Br J Nutr.* 2000; 84(S1):75-80. DOI: 10.1017/S0007114500002282.

Laestander C. Comparison of three different colostrum feeding methods on passive transfer of immunity, growth and health in dairy calves. PhD Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2016.

Morter RL. Feeding colostrum to calves. Cooperative Extension Service Purdue University West Lafayette, IN 47907, Indiana, 2003.

Özen N. Süt Sığırlarının Beslenmesi. Akd. Üniv. Ziraat Fak. Yayınları. Yardımcı Ders Notu No:3. Antalya, 1999.

Quigley JD, Drewry JJ. Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *J Dairy Sci.* 1998; 81(10):2779-2790.

Quigley JD. Using the colostrometer to measure colostrum quality. <http://www.calfnotes.com/pdffiles/CN022.pdf> 2001. Accession date: 15.10.2009.

Selk GE. Management factors that affect the development of passive immunity in the newborn calf. <http://www.iowabeefcenter.org/bch/PassiveImmunityMgt.pdf>. Accession date: 21 Temmuz 2014.

Şentürk S. Olgu Tartışmalı Buzağların İç Hastalıkları, F. Özsan Matbaacılık, Bursa, 2012.

Wattiaux MA. Heifer Raising Birth to Weaning 28 Importance Of Colostrum Feeding. <http://Babcock.Cals.Wisc.Edu/Downloads/De/28.En.Pdf>. 2014.

Waterman D. Colostrum. <http://www.moormans.com/feedfacts/dairy/dairymar98/colostru.html>. 1998.

Weaver DM, Tyler JW, VanMetre DC, Hostetler D, Barrington GM. Passive transfer of colostral immunoglobulin in calves. *J Vet Intern Med.* 2000;14:569-577. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2000.tb02278.x

Instruction for Authors

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

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

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

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

Each author accepts all ethical responsibility of the article and all authors agree with the content of the study. After article is checked by Professional Plagiarism Prevention program, article will be sent to authors. Articles are checked by iThenticate® program, when plagiarism or self-plagiarism are detected, they will not be evaluated for publication.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

Journal:

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

Book section:

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

Web page:

Anonymous. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?tb_id=46&cust_id=13;Accessien date: 02.01.2012.

Thesis:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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