



# Eurasian Journal of Health Sciences

## Avrasya Sağlık Bilimleri Dergisi

ISSN 2651-3501





**2<sup>nd</sup> INTERNATIONAL CONFERENCE ON  
"VETERINARY BIOCHEMISTRY and CLINICAL  
BIOCHEMISTRY: ADVANCES and CHALLENGES in  
UNDERSTANDING the MECHANISMS of DISEASES"**

OCTOBER 24-26, 2019  
ANKARA / TURKEY

**2<sup>nd</sup> International Conference on “Veterinary  
Biochemistry and Clinical Biochemistry:  
Advances and Challenges in Understanding the  
Mechanism of Diseases**

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı  
Altındag/Ankara/Turkey  
06110

[vbcb2019@gmail.com](mailto:vbcb2019@gmail.com)

<http://vbcb2019.veterinary.ankara.edu.tr>

## **Honorary President**

Prof. Dr. Erkan İBİŞ  
Rector of Ankara University

Prof. Dr. Belgin SARİMEHMETOĞLU  
Dean of Faculty of Veterinary Medicine

**Local Organizing Committee** (Alphabetical order)

Arif Altintas (Ankara University)

Zafer Bulut (Selcuk University)

Mine Erisir (Firat University)

Gorkem Kismali (Ankara University)

Ogunc Meral (Ankara University)

Mert Pekcan (Ankara University)

Berrin Salmanoglu (Ankara University)

Tevhide Sel (Ankara University)

Hamdi Uysal (Ankara University)

## **Scientific Committee** (Alphabetical order)

Ayşen ALTINER (Istanbul University-Cerrahpasa)

Vahdettin ALTUNOK (Selcuk University)

Burcu ASLAN (University of Texas, USA)

Tünay Kontaş AŞKAR (Karatekin University)

Emine ATAKİŞİ (Kafkas University)

Onur ATAKİŞİ (Kafkas University)

Gülcan AVCI (Kocatepe University)

Nuri BAŞPINAR (Selcuk University)

Fulya BENZER (Munzur University)

Ayşegül BİLDİK (Adnan Menderes University)

Tülay BÜYÜKOĞLU (Mehmet Akif Ersoy University)

Sefa ÇELİK (Kocatepe University)

Sena ÇENESİZ (Ondokuz Mayıs University)

Miyase ÇINAR (Kırıkkale University)

Gülay ÇİFTÇİ (Ondokuz Mayıs University)

Semiha DEDE (Yuzuncu Yıl University)

Yeter DEĞER (Yuzuncu Yıl University)

Alparslan Kadir DEVRİM (Kırıkkale University)

Suat ERDOĞAN (Trakya University)

Meryem EREN (Erciyes University)

Ali ERTEKİN (Ondokuz Mayıs University)

Herbert FUHRMANN (Leipzig University, Germany)

Theodora Mircheva GEORGİOVA (Trakia University, Bulgaria)

Nazmiye GUNES (Uludag University)

Sema GÜRGÖZE (Dicle University)

Mesut Bünyami HALICI (Ataturk University)

Seyfullah HALİLOĞLU (Selcuk University)

Fatih Mehmet KANDEMİR (Ataturk University)

Orhan KANKAVİ (Mehmet Akif Ersoy University)

Mahmut KARAPEHLİVAN (Kafkas University)  
Necati KAYA (Celal Bayar University)  
Funda KIRAL (Adnan Menderes University)  
Zuzana KOSTECKA (University of Veterinary Medicine and Pharmacy  
in Košice, Slovakia)  
Firuze KURTOĞLU (Selcuk University)  
Şaban MARAŞLI (Kafkas University)  
Handan MERT (Yuzuncu Yıl University)  
Nihat MERT (Yuzuncu Yıl University)  
Farnoud NASIRİ (Iran)  
Cevat NISBET (Ondokuz Mayıs University)  
Mehmet NİZAMLIOĞLU (Selcuk University)  
Sema Temizer OZAN (Fırat University)  
Ayla ÖZCAN (Gazi University)  
Necmi ÖZDEMİR (Fırat University)  
Kemal Özdem ÖZTABAK (Istanbul University-Cerrahpasa)  
Ümit POLAT (Uludag University)  
Khalid RAHMAN (Liverpool John Moores University, England)  
Serkan SAYINER (Near East University, TRNC)  
Behiç SERPEK (Selcuk University)  
Catia Maria SORGATO (University of Padova, Italy)  
Nalan BAYŞU SÖZBİLİR (Kocatepe University)  
Meltem TANRIVERDİ (Uludag University)  
Nezir Yaşar TOKER (Istanbul University-Cerrahpasa)  
Pınar Alkım ULUTAŞ (Adnan Menderes University)  
Necati UTLU (Ataturk University)  
Hasret YARDİBİ (Istanbul University-Cerrahpasa)  
Gül Fatma YARIM (Ondokuz Mayıs University)  
Seval YILMAZ (Fırat University)  
Beran YOKUŞ (Dicle University)  
Fatmagül YUR (Muğla Sıtkı Kocman University)



KONGRE TAM METIN BILDIRILERI  
&  
CONGRESS FULL TEXT ARTICLES



## Earthquakes and Their Effects on Living Organisms

Nihat MERT

Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Van Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

### ABSTRACT

Although there is a lot of scientific evidence that animals can feel the coming of the earthquake and that their organisms have undergone profound behavior and physiological changes before and after the earthquake, these studies have always been controversial. Existing data on abnormal animal behavior before the earthquake, with the exception of individual events, is still insufficient. Behavior change that occurs a few days or weeks prior to the earthquake is more rare. These are known to be exhibited by fish, rodents, wolves and snakes. The studies hypothesis that frog *B. bufo* can predict large seismic events and adjust its behavior accordingly. Before the earthquake, insulin sensitivity and stress levels were measured by chance in rats that were part of another study. Some biochemical changes were detected by chance before the earthquake. Defects in insulin stimulation and a decrease in glucose uptake in skeletal muscle and adipose tissue have been found, and insulin sensitivity has been shown to decrease. These changes have been associated with significantly increased plasma corticosterone concentration and high HSD11B1 mRNA expression in skeletal muscle and adipose tissue. An increase in insulin resistance may be attributed to systemic stress. Realizing that food intake in rats showed a sudden increase two days before the earthquake and reached its peak on the day of the earthquake, the researchers said that the increase in stress level in rats revealed the possibility of exposure to physiological changes before the earthquake and ultimately leading to an increase in food intake and IR. Another three-year-old study, study, in a seismically active area, two red ant mounds were monitored 24/7 with color, high-resolution infrared sensor cameras, and the standard daily life of ants was examined with 45000 hours of video recordings. Video observations and times of local earthquakes have shown a change in the behavior of ants before the earthquake. Night rest and daily activity were suppressed and their routine life did not last until the next day. Despite the successful experiments, it is necessary to observe ants or other animals' behavior in longer earthquake-free times as early earthquake stimuli. Serious studies on animal experiments are needed to predict time of earthquake.

**Key words:** Animal Behavior ,Biochemical Changes, Earthquakes.

## Deprem ve Canlılar Üzerindeki Etkileri

### ÖZET

Hayvanların depremin geldiğini hissedebildiğini ve organizmalarının deprem öncesi ve sonrası döneminde derin davranış ve fizyolojik değişikliklere uğradığını gösteren birçok bilimsel kanıt olmasına rağmen bu çalışmalar her zaman tartışmalar doğurmuştur. Bireysel olaylar haricinde deprem öncesi anormal hayvan davranışları hakkında mevcut veriler hala yetersizdir. Deprem öncesinde birkaç gün veya hafta meydana gelen davranış daha nadirdir. Bunları balıkların, kemirgenlerin, kurtların ve yılanların sergilendiği bilinmektedir. Çalışmalarda kurbağa *B. bufo*'nun büyük sismik olayları tahmin edebileceği ve davranışını buna göre ayarlayabileceği hipotezi kurulmuştur. Deprem olmadan önce, başka bir çalışmanın parçası olan sıçanlarda insülin duyarlılığı ve stres seviyesi tesadüfen ölçülmüştür. Tesadüfi olarak deprem öncesi bazı biyokimyasal değişimler saptanmıştır. İnsülin uyarımında kusurlar ve iskelet kası ve yağ dokusunda glikoz alımında bir düşüş tespit edilmiş, insülin duyarlılığının azaldığı gösterilmiştir. Bu değişiklikler, iskelet kası ve adipoz dokuda önemli ölçüde artmış plazma kortikosteron konsantrasyonu ve yüksek HSD11B1 mRNA ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir. İnsülin direncindeki (IR) artış sistemik strese bağlanabilir. Sıçanlardaki gıda alımının depremden iki gün önce ani bir artış gösterdiğini ve depremin olduğu gün zirveye ulaştığını fark eden araştırmacılar, sıçanların, stres seviyesindeki artışın deprem öncesi oluşan fizyolojik değişikliklere maruz kalma ve sonuçta gıda alımı ve IR'de artışa yol açma ihtimalini ortaya koyduğunu söylemişlerdir. Üç yıl boyunca, sismik olarak aktif bulunan bir bölgede, iki kırmızı karınca höyüğü, renkli, yüksek çözünürlüklü bir kızılötesi sensör kameralarla 7/24 izlenmiş, 45000 saat video kayıtlarıyla karıncaların standart günlük yaşamı incelenmiştir, Video gözlemleri ve yerel depremlerin meydana gelme zamanları, karıncaların depremden önceki davranış saatlerinde bir değişiklik olduğunu göstermiştir. Gece istirahati ve günlük aktivite bastırılmış ve rutin yaşamları ertesi güne kadar devam etmemiştir. Elde edilen başarılı denemelere rağmen erken deprem uyarıcıları olarak, karıncaların veya başka hayvanları davranışlarının daha uzun süreli depremsiz zamanlarda gözlemlenmesi gereklidir.

**Anahtar kelimeler:** Biyokimyasal Değişimler, Deprem, Hayvan Davranışları.

## GİRİŞ

Yer kabuğunun derin katmalarının kırılıp yer değiştirmesi ya da yanardağların püskürme durumuna geçmesi nedeniyle oluşan sarsıntılardır. Başka bir deyişle yer kabuğunun derinliklerindeki bir bölgenin aniden kırılması ve burada depolanmış deformasyon enerjisinin sismik enerjiye dönüşerek dalgalar halinde yer kabuğunu üzerindekiyle birlikte titreştirmesidir. Yer kabuğunu oluşturan levhaların birbirine sürtündükleri, birbirlerini sıkıştırdıkları, birbirlerinin üstüne çıktıkları ya da altına girdikleri bu levhaların sınırları dünyada depremlerin oldukları yerler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Deprem dalgalarının yayıldığı sırada yeryüzünde, bazen gözle görülebilen, kilometrelerce uzanabilen ve "Fay" adı verilen arazi kırıkları oluşabilir. Fayların büyük bir bölümü levha sınırlarında ya da yakınında ortaya çıkar. Faylar, kayanın-kırılgan özelliği olmasından dolayı-yüksek basınç (gerilme, sıkışma veya bükülme) altında kırılmasıyla oluşur. Bu kırıklar bazen yeryüzünde gözlenemez. Yüzey tabakaları ile gizlenmiş olabilir. Bazen de eski bir depremden oluşmuş ve yeryüzüne kadar çıkmış, ancak zamanla örtülmüş bir fay, yeniden oynayabilir. Fayların hareketli olduğu bölgelere "Aktif Fay Kuşağı" adı verilir (Brace ve ark. 1996).

Birbirini iten ya da diğerinin altına giren iki levha arasında, harekete engel olan bir sürtünme kuvveti vardır. Bir levhanın hareket edebilmesi için bu sürtünme kuvvetini gidermesi gerekir. Sürtünme kuvveti aşıldığı zaman bir hareket oluşur. Depremler tektonik gerilmelerin artmasından kaynaklanmaktadır. Bu kritik bir sınıra ulaştığında, felaketle sonuçlanır. Odak noktasından başlayan ve üst merkeze ulaşan dalgalar, arazide ikinci bir hareket yaratır ki bu harekete "Yüzey Dalgaları" denir. Yüzey Dalgaları üst merkezden her doğrultuda yayılmaya başlar. Hareket hızı daha yavaştır, ancak yıkıcı etkisi daha büyüktür. Odak noktasından başlayıp her doğrultuda yayılan ilk sismik dalgaya P (Primary-Birincil) dalgası denir. P dalgasının yayılma hızı 4-7 km/sn civarındadır. Bu hareket katı, sıvı ve hava ortamında ilerleyebilir. İçinden geçtikleri kayaları sıkıştırır ve gerer. Zemindeki ikinci tip sismik dalgalar S (Secondary-İkincil) dalgaları olup, yapılar P dalgasından sonra ulaşır. Hareket hızı 2-6 km/sn arasındadır. S dalgaları katı ortamlarda ilerleyebilir. Depremlerde esas

hasarı S dalgaları vermektedir. S dalgaları kayaları aynı anda hem yukarı-aşağı, hem de iki yöne doğru hareket ettirir (Bluestone 2010)

7 büyüklüğünde bir deprem, 2000'den fazla Hiroşima sınıfı atom bombasınıninkine eşdeğer bir enerji açığa çıkarır. Büyüklük ölçeğinin üstel olduğu, 9 büyüklüğünde bir deprem tarafından salınan enerji, 2.000.000'den fazla Atom bombaya eşdeğerdir. Bununla birlikte, büyük sismik olaylar tarafından salınan çok büyük miktarlarda mekanik enerji ışığında, fiziksel açıdan bakıldığında, Dünya'nın bu kadar büyük ölçekli felaketlerden önce tanımlanabilir sismik olmayan ve mekanik olmayan sinyaller üretmeyeceği düşünülemez. Karada, havada ve suda sıradışı hayvan davranışı hikayelerinden, elektromanyetik radyasyon emisyonuna, iyonosferin alt kısmındaki elektron dağılımında belirgin değişikliklere kadar değişen şaşırtıcı çeşitlilikteki fenomenleri kapsar( Lee ve ark. 1976).

### Doğanın Deprem İhbarı

İnsanların öğrenmesi ile diğer canlıların öğrenmesi birbirine benzemektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla insan davranışları açıklanabilir. Davranış değişikliği öğrenmenin sonucu olarak ortaya çıkar. Öğrenme ölçülebilir ve gözlenebilir olaylar üzerinde odaklanarak incelenebilir.

Doğada anekdot veya gözlem halinde bazı değişimler bildirilmiştir. Bunlardan bazıları; Gökyüzündeki değişimler, deprem ışıkları, alev topları, deprem bulutları,

yıldırımlar, gökkuşağı, hava sıcaklığındaki değişimler, yerden anlam verilemeyen bir uğultu duyulması , basınç artışı: Su basıncında 1-1.5 barlık artış olur. Su olağan sıcaklığın 1-2 derece üzerinde ısınır ve 1 ile 2 hafta öncesinden yeni su kaynakları oluşur ya da var olan kaynak kuruyabilir. Su içinde karbondioksit, metan ve radon gazı içeriği artar. Su acılaşır ya da tatlılaşır, çürük yumurta ve kükürt kokusu gelir. Suyun iletkenliği değişir, radon, civa, helyum, karbondioksit artışı gözlenir. Su içinde hava kabarcıkları oluşur. Dere suları kesilir, kurur ya da çoğalır. (Friedemann ve Stolc 2013)

Hayvanlarda deprem öncesi gözlenen değişimler genelde davranış değişiklikleri ile paraleldir. Saldırgan ve vahşi hayvanlar sakinleşebilir, tersine uysal ve evcil hayvanlarımızı

saldırgan davranışlar gösterebilir. Örnek olarak At, eşek, inekler tasmalarını koparırlar. Ahır kapılarından dışarı çıkmak isterler. Tepelere doğru koşarlar. Tavşan ve fareler yapıların üst katlarına kaçışır, direklerle tırmanır ve yere inmek istemezler. Domuzlar: Hızla yukarıya doğru koşarlar. Toprağı delicesine eşelerler. Kediler: Kutu ya da çöp bidonu içine atlarlar. Top gibi sıkışıp, şiddetle titrerler. Köpekler korku ile panik halinde havlarlar.

Balıklar göl ya da deniz tabanının ısınması sonucu yüzeye yakın yüzerler. Yılan balıkları ortadan kaybolur. Balıklar nedensiz bir şekilde ölürlür. Ördek, kaz ve kuğular göle girmek istemezler. Göldekiler ölebilir. İpek Böcekleri arka arkaya dizilirler. Martılar çembersel olarak uçarlar. Büyükbaş hayvanlar: 3-4 gün önce elektromanyetik ışınlardan etkilenmeye başlarlar (Evernden 1977, Logan 1977). Karıncalar yuvalarından dışarıya çıkarlar ki 2011 Van depreminde tarafımdan da gözlenmiştir.

### Deprem Tahmini Yapmak

Deprem yeri, zamanı ve şiddetini belli bir belirsizlik dahilinde tespit etmektir. Bu kavramı deprem erken uyarı sistemlerinin temel aldığı, sismik dalgalar arasındaki yayılma farkı ile karıştırılmamalıdır. Deprem erken uyarı sistemleri, deprem olduktan hemen sonra sismik dalgaların yayılım farkından dolayı, saniyeler öncesinden yıkıcı dalga'nın geleceğini haber verirken; deprem tahmini sistemleri, depremin olabileceğini saatler veya günler öncesinden tespit edebilmektedir (Krasnogorskaya ve ark. 1984)

Deprem tahminleri, deprem öncesinde yer kabuğunda oluşan devasa basınçların etkisiyle tetiklenen bir dizi fiziksel olayın gözlemlenmesine dayanır. Bu fiziksel olaylar; yer kabuğu deformasyonu, jeoelektriklenme, jeomanyetiklenme, ses ötesi dalgalar, iyonosfer toplam elektron içeriğinde değişiklikler, sıcaklığın artması, nemin azalması, yeraltı sularının kimyasının değişmesi ve topraktan Radon gazı salınımında artış olarak sıralanabilir.

Büyük depremlerden önce alışılmadık hayvan davranışına dair raporlar sayısızdır, bazıları eskilere dayanır. Hayvanların tepki verdiği görüldüğü fiziksel ya da kimyasal ipuçlarının doğası hakkında çok az şey bilindiğinden, bazı bilimsel çevrelerde raporları reddetme ve onları "anekdot" olarak adlandırma eğilimi güçlüdür. Bununla birlikte, genellikle çarpıcı şekilde

benzer olan gözlemler, yüzyıllar boyunca farklı kıtalarda, farklı sismik olarak aktif bölgelerde yaşayan insanlar tarafından bildirilmiştir. Bu raporların sadece "anekdot" olmadığı, farklı gözlemlerde saptanan ortak bulgular da makul bir tartışma yapılabilir. Birden fazla bağımsız gözlemlerle onaylandıklarından, çevrede hayvanların yanıt verdiği fiziksel ve / veya kimyasal uyarımların varlığı incelenebilir. Zira orta ila büyük depremler için dünyamız bu uyarımları olaydan yaklaşık iki hafta ila bir gün, bazen de sadece birkaç saat gibi bir zaman aralığında üretiyor gibi görünmektedir (Turcotte 1991).

### Elektromanyetik Dalgalar ve Deprem

Elektromanyetik dalgalara maruz kalmanın çok çeşitli organizmalar üzerinde fizyolojik etkileri olabilir (Freund ve Stolc 2013). Onlarca yıldır, güneş ve jeomanyetik aktivitedeki değişikliklerle ilişkili önemli fiziksel, biyolojik ve sağlıkla ilgili etkileri bildiren birçok çalışma yapılmıştır. Güneş ve jeomanyetik aktivitedeki değişiklikler, ortamdaki son derece düşük frekans (ELF) ve ultralow frekans (ULF) alanında, özellikle Dünya yüzey ortamının geniş bant EM alanına (0.1-50 Hz) sokulması ile değişikliklere neden olur. Hem deprem öncesi koşullar altında hem de jeomanyetik fırtınalar sırasında ortam ELF alanındaki bu değişiklikler ve biyosferde belirtilen çeşitli etkiler arasında nedensel bağlantı olabilir. Kuşlar ve kaplumbağalar dahil hayvanlar Dünya'nın manyetik alanını algılayabilir ve göç sırasında seyahat rotası olarak kullanabilir. Örneğin, Bar kuyruklu Godwit kuşu, hiç durmadan 10.200 km uçarak en uzun kuş göçlerinden birine sahiptir. (Ritz 2011)

Elektron transfer reaksiyonlarının hızlarının ve yönünün (bir elektronun bir kimyasal türden (elektron donörü olarak adlandırılan) diğerine (elektron alıcısı olarak adlandırılan) geçebilme oranının ortamdaki EM alanı etkilerine maruz olduğunu göstermektedir. Bu in vivo elektron taşıma işlemi tüm organizmalar için esastır, çünkü bir membran boyunca H + iyonlarının (protonlar) transferi ile biyokimyasal olarak birleşir. Elde edilen elektrokimyasal proton gradyanı, adenosin trifosfat (ATP) formunda kimyasal enerji üretmek için kullanılır. Önemli olarak, evrensel ETC, zayıf ortam EM alanının etkisini artıran güçlü manyetik momentli bileşenlerden (örneğin demir oksitler, örneğin heme) yapılır [32]. Şaşırtıcı bir şekilde, ATP'yi sentezleyen ATP sentaz adı verilen moleküler enzim motorunun dönme frekansı

da ELF'de salınım yapar (10-70 Hz) (Nakamoto 2008) .Sonuç olarak, ortamdaki EM alanı ve yaşamın en temel biyokimyasal süreci arasında EM rezonansı ile termodinamik bağlantı mümkündür. ATP sentezinin dökmesini duraklatmanın veya dönme yönünü değiştirmenin sırasıyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve ATP'nin tükenmesine yol açtığını not etmek önemlidir. Her iki biyokimyasal olay, in vivo metabolik strese neden olarak (örn. Oksidatif stres), anormal hayvan davranışını şekillendirir. Bu nedenle organizmaların ortamd EM alanında oluşan deprem kaynaklı değişimleri saptamaları muhtemeldir, çünkü EM bozulmaları canlı hücrelerde bilinen evrensel biyokimyasal düzen için zaman belirleyici fiziksel temeli etkileyebilir (Lloyd, ve Murray 2006).

Manyetik alanların; DNA, RNA ve protein sentezi, hücre bölünmesi, membrandan kalsiyum giriş çıkışı ve sinyal iletimi, üzerine etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Zayıf statik manyetik alanların insan sağlığına zararlı olup olmadığı hakkında kesin bilgi olmamakla beraber, deney hayvanları üzerine yapılan çalışmalarda hormon ve enzim seviyesini değiştirebildiği, dokularda bulunan kimyasalların hareketini engelleyerek biyolojik değişikliklere neden olabileceği vurgulanmaktadır.

### Ozon ve Deprem

Büyük depremler sırasında veya sonrasında ozon seviyelerinde bir artış rapor edilmiştir. Yüzeyde veya yakınında kayaların çatlaması elektrik boşalması, ozon oluşumuna neden olur yorumu yapılmaktadır. Bununla birlikte, büyük depremlerden önceki günlerde ozon seviyelerinde gözle görülür bir artış için, yüzeylerin veya yüzeye yakın kayaların kırılmasının gerçekleşemediğine ait raporlar da vardır. 1985'e kadar Orta Asya'da meydana gelen 4,5 ila 7,2 şiddetinde meydana gelen kuvvetli depremlerin ardından 5 gün ila 4 gün öncesine kadar bölgesel ozon seviyelerinin ortalaması ölçülmüş bildirilen 88 olayda bu depremlerden en fazla 2 ila 4 gün önce yüksek ozon içerikleri gözlenmiştir (Ganguly 2009, Tyrtshnikov 1996)

Yüksek pozitif hava iyonizasyonuna ve yer seviyesinde ozon üretimine maruz kalan hayvanların, ortamdaki bu tahriş edici maddelerin normalden daha yüksek seviyelerde görünmesine yanıt olarak anormal davranış sergilemesi beklenebilir. Pozitif hava iyonlarının olması durumunda, hayvanların tepkisi kanda bir stres hormonu olan serotonin seviyesiyle tetiklenebilir. Asit kokulu bir eser gaz olan Ozon 40 nmol / mol veya 40

ppb kadar düşük konsantrasyon seviyelerinde bile, oksidatif stresin indüklenmesiyle inflamatuvar bir ajan olarak ta kabul edilmektedir (Krueger ve Reed 1976).

### Radon

Radon asil bir gazdır ve kimyasal olarak inert olduğu düşünölmektedir, topraktan salındığından yalnızca büyük depremlerden önce, yeraltı yüzeyinde mikro çatlamanın meydana gelmesi ile oluşmaktadır, radon asil gazların en ağır olduğu için, toprakta organik bileşikler oluşturan, xenon'dan kimyasal olarak daha fazla reaktif olması gerekir., Alttan yüzeye, üstteki topraktan difüzyon yoluyla toprak organik maddelerine kimyasal olarak absorbe olması nedeniyle radon atomlarının tutulması beklenir. Deprem aktivitesi olan bölgeler üzerinde toprak tabakasına yüksek yük taşıyıcılarının gelmesi, tercihen Xe -Radon üçlü karbon bağlarına saldırarak, onları çift veya tek bağlara oksitleyecektir ve böylece radonu serbest kalacaktır. Radon atomları daha sonra, yüzeye yayılarak sürdürmekte serbest olacaklardır (Freund 2010).

Bölgesel CO konsantrasyonu, her zaman zemine yakın alanda en yüksek, yani en düşük irtifada, 100 ila 150 ppb arasındaki değerlere sahiptir. Bununla birlikte, 19 Ocak 2001'de 7.6 şiddetindeki sismik olaydan bir haftadan daha uzun bir süre önce başlayan CO konsantrasyonu artışı 240 ppb ile maksimum seviyeye ulaşmıştır. Havadaki toplam CO miktarı, yüzeyin yakınında potansiyel olarak öldürücü bir konsantrasyon olan 500 ppm'e ulaşmak için yeterlidir. Çünkü CO, tüm aerobik organizmalarda metabolik döngünün oksidatif solunum fazına ilerlemesini etkiler. Gerçekten de CO, sitokrom c oksidazdaki heme bağlanarak siyanide benzer bir şekilde hareket eder ve artan ROS üretimine yol açan elektron taşınımı ve ATP üretimini inhibe eder. Redoks döngüsü sırasında CO kaynaklı ROS üretiminin bu temel ve evrensel mekanizması tüm aerobik hücrelere uygulanabilir. [67]. Deprem; strese karşı metabolik dönüşümü azaltan hücresel bir sinyalleşme molekülü olarak işlev gören gaz halindeki CO salınımına neden olabilir. Tabiatıyla CO'den en çok etkilenen hayvanlar karada yaşayan hayvanlar olacaktır (Varon, ve Marik 1997). CO kısmi basıncının 500 ppm konsantrasyon seviyelerine yükselmesi sonucu canlılar zehirlenebilir ve ölebilirler.. Mayıs-Haziran 2012'de Kuzey İtalya'da bir dizi orta dereceli depremle bağlantılı olarak farelerin kitlesel ölümü ile ilgili anekdot

raporları vardır. Ölü hayvanların fiziksel yaralanma belirtisi göstermediği bildirilmiştir (Anon.2013).

### Deprem Sırasındaki Hayvan Davranışlarına Örnekler

22 Ekim 1926'daki Leninakan depreminden önce olağandışı köpek davranışları gözlenmiş takiben 30 ve 40 dakika aralıklarında üç şok kaydedildi. Agin köyünde, köpekler 7-20 km epicentral mesafedeki ilk şoktan önce, ikinci şoktan birkaç dakika önce ve üçüncü şoktan önce havlayarak köyden tarlalara koştular. Koshevank köyündeki köpekler (merkez üssünden 20 km uzaklıkta) burunları kuzeye bakacak şekilde, ana depremin başlangıcında ulumaya başlamıştır. Kuzeybatı Ermenistan'daki 17 Ocak 1982'deki Gukasyan depreminden olaydan 18 saat önce, domuzlar alışılmadık şekilde başlarını duvarlara çarpmak, taşları yalamak, yemek yemeyi reddetmek ve kendi aralarında savaşmak gibi huzursuz davranışlar göstermiş, deprem oluşana kadar bu şekilde devam edip sakinleşmişlerdir (Nikonov 1991).

7 Ocak 1937'deki tanınmış Erivan depreminden önce sirkteki en az 10 at ve birkaç düzine köpek huzursuzluk belirtileri göstermeye, atlar kişnemeye, tepinmeye ve tavlalarından uzaklaşmaya başladı. Köpekler kafeslerinde ulumaya başladı. Bütün bunlar, ilk şoktan önce ve ertesi gün olacak depremden, yaklaşık üç saat önce gerçekleşti ve gerçek depreme kadar devam etti. Şok bittikten sonra hayvanlar sessizleşti. Zangezur bölgesinden 9 Haziran 1968, Zangezur depreminden bir saat kadar önce olağandışı bir yılan göçüne dair raporlar vardır (Nikonov 1981).

.Anormal olduğu düşünülen davranışların en sık ve dolayısıyla tipik belirtileri, böceklerden memelilere kadar birçok hayvanda gözlenen artmış motor aktivite, ajitasyon (korku belirtileri), normal yerleşim yerini terk etme dürtüsü ve yiyeceklerin reddedilmesi, yabani hayvanlar insanlardan korkmaması ve evcil hayvanların saldırgan tavırlar göstermesidir (Krasnogorskaya ve ark. 1984).

### Deprem Sırasında Ratlarda Ölçülen Biyokimya Değişimler

Hayvanlarda deprem öncesi (PE) davranış çalışması her zaman tartışmalara neden olmuştur. Hayvanların depremin geldiğini hissedebildiğini ve organizmalarının PE döneminde fizyolojik değişikliklere uğradığını gösteren çok az bilimsel kanıt vardır. Richter ölçeğinde 8 büyüklüğündeki Wenchuan

depremi, 12 Mayıs 2008'de saat 14: 28'de (yerel saatte) Çin'in güney-batı kısmını vururken deprem gününde, asıl olayın gerçekleşmesinden önce, aslen başka bir çalışmanın parçası olan sıçanlarda insülin duyarlılığını ve stres seviyesi tesadüfen ölçülmüştür. İnsülin sinyalinde kusurlar ve iskelet kası (SkM) ve yağ dokusunda (AT) glikoz alımında bir düşüş saptanmıştır. Bu durum insülin duyarlılığının azaldığını gösterirken, SkM ve AT'de önemli ölçüde artmış plazma kortikosteron konsantrasyonu ve yüksek HSD11B1 mRNA ekspresyonu ile ilişki tesbit edildi. İnsülin direncindeki (IR) artış, yüksek lokal (SkM ve AT) ve sistemik strese bağlanabilir. İlginç bir şekilde, sıçanlardaki gıda alımının depremden iki gün önce ani bir artış gösterdiğini ve depremin oluş gününde zirveye ulaştığı görüldü. Gözlemler, sıçanların, stres seviyesindeki bir artıştan oluşan PE fizyolojik değişikliklerine maruz kalma ve sonuçta gıda alımı ve IR'de artışa yol açma ihtimalini ortaya koymaktadır. Çalışmanın ilk etabının Nisan ayında tüm sıçan gruplarında yapıldığından deprem günü ölçümlerin bir ay sonraki tekrarlar olduğunu belirtmeliyiz. Her iki grupta da ölçülen parametrelerde herhangi bir değişiklik yapmadan, aynı deney ortamını kullanarak çalışmaya devam etmelerine rağmen, şaşırtıcı bir şekilde iki ölçüm arasındaki farkları gözlenmiştir (Lu ve ark 2010)

Buna göre tekrarlanan 2. deneyde yani depremin olduğu periyotta şiddetli bir insülin direnci (IR) ve plazma glukokortikoid seviyelerinde bir artış olduğunu ortaya konmuştur. Dahası, deprem meydana gelmeden iki gün önce başlayan ve deprem gününe kadar gıda alımında önemli bir artış gözlemlenmiştir. Kontrol deneyi ile tekrarlanan deney arasındaki tek faktör deprem olduğundan, stres seviyesi, IR ve gıda alımındaki değişikliklerin DEPREM ÖNCESİ fizyolojik değişikliklerine atfedebileceği hipotezini öne sürmüşler. Ek olarak, Wuhan Hayvanat Bahçesi'nin bazı hayvanlarında Wenchuan depreminden önce olağandışı davranışlara ilişkin gazete raporlar olduğundan, çalışmadaki sıçanlarda görülen değişikliklerin depremden kaynaklanabileceğini söylemek garip olmaz (Lu ve ark. 2010).

Hayatta kalan organizmalarda stres tepkisi glukokortikoid hormonunun işe karışmasıyla şekillenir. Glukokortikoid (sıçanlarda kortikosteron, insanda kortizol), organizmanın çok çeşitli stresörlere maruz kalması sırasında iç

çevreyi korumak için karmaşık bir şekilde etkileşime giren sempato-adrenomedüller ve hipotalamo-hipofiz-adrenokortikal sistemlerin ortak yoludur. Glukokortikoidin hedef dokular üzerindeki etkisi, sadece dolaşımdaki steroid konsantrasyonları ile değil aynı zamanda hücre içi 11b-hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1 (HSD11B1) ile düzenlenen hücre içi aktif glukokortikoid konsantrasyonları ile belirlenir.HSD11B1'in rolü, aktif olmayan glukokortikoidlerin in vivo aktif glukokortikoidlere dönüşümünü katalize etmektir ve HSD11B1'in ekspresyon düzeyi aktivitesi ile pozitif olarak ilişkilidir. Saptanan metabolik değişiklikler artmış plazma kortikosteronu, kas ve yağda yüksek HSD11B1 ekspresyon seviyesi ile ilişkiliydi. Glukokortikoidlerin insanlarda ve hayvan modellerinde gıda alımını arttırdığı bildirilmektedir. Dolayısıyla, PE sıçanlarda artan enerji alımı, plazma kortikosteron düzeyindeki artışa bağlanabilir. Bu çalışmada, plazma kortikosteron seviyesinin, SkM ve AT'de HSD11B1 ekspresyonunun yukarı regülasyonu ile ilişkili olarak, PE sıçanlarında anlamlı derecede arttığını gösterildi. Araştırmadan elde edilen bulgulara göre, sistemik ve lokal glukokortikoid seviyelerinde bir artışın şiddetli IR ile sonuçlandığını söylemektedirler. (Lu ve ark. 2010, Kotelevtsev ve ark. 1997)

PE periyodundaki bütün sıçanlarda hiçbir gözle görülebilir travma görülmedi. Dolayısıyla, bu çalışmada yüksek stres seviyesinin mekanizması deprem sonrası diğer organizmalardakinden farklı olabilir. Muhtemel sismik haberciler hakkındaki birçok raporda; sarsıntı, nem, elektrik ve manyetik sinyaller gibi çevresel faktörlerin hayvanlarda anormal davranışlarla bağlantılı olabileceğini göstermektedir. Aslında, büyük depremlerden önce anormal bir elektromanyetik sinyaller defalarca gözlenmiş ve zayıf elektromanyetik alanların biyolojik etkiler yarattığı bilinmektedir.

Hayvanların deprem öncesi davranışlarındaki bozukluklar için pek çok teori ileri sürülmektedir. Hayvanların işitsel frekans aralığı insanınkinden daha yüksektir. Örneğin insanlar saniyede frekansı 20 - 20.000 Hz arasında olan sesleri duyabilirlerken köpekler 100.000 Hz, fareler ise 40.000 Hz frekanslı sesleri duyabilmektedirler. Bazı hayvanlar deprem öncesinde meydana gelen manyetik alandaki değişiklikleri

algılamaktadır.

Ancak, bu çalışmanın önceden tasarlanmadığı, beklenmeyen bir keşiften sonra devam eden bir deneye göre ayarlandığı unutulmamalıdır. Sadece bu hormonal ve metabolik değişiklikleri incelenmiş ve önerilen nedensel bağlantı bu araştırmada kesin olarak test edilememiştir. Araştırmacılar, stresin PE'nin fizyolojik değişimlerinden kaynaklanabileceğini varsaymakta, bu da farelerin onlar tarafından tam olarak açıklanamayan mekanizmalar aracılığıyla depremin geldiğini hissedebildiğini gösterdiğini öne sürmüşlerdir (Lu ve ark 2010).

### Karınca ve Deprem

Böcek fizyolojisini veya davranışını etkileyebilecek deprem öncülleriyle ilgili çeşitli etkiler öne sürülmüştür. Anekdotlar, depremleri ve öncüllerini karınca kolonisi aktivitesindeki değişikliklere (hatta koloni tahliyesi derecesine kadar bile olsa) bağladığını bildirirse, o zaman karınca davranışını kaydetmek ve analiz etmek, etkili bir deprem tahmini aracı olabilir. Depremler şu anda tahmin edilememektedir, bu nedenle, karınca davranışının öngörücü bir mekanizma olarak kullanılmasının test edilmesi zordur, çünkü büyük bir deprem öncesinde ve sırasında tesadüfen karınca taraması verilerinin elde edilmesi olası değildir. Eğer depremle ilgili etkiler aerobik katabolizmayı belirli bir sıcaklık ve aktivite oranında modüle etmişse, bu deprem gününde anormal katabolik verilere yol ve açacaktır (Ulomov ve Malashev 1971).

Almanya'da araştırmacılar üç yıl boyunca, sismik olarak aktif bulunan bir bölgede, iki kırmızı ağaç karınca yuvasını renkli, yüksek çözünürlüklü bir kızılötesi sensör kameralarla 7/24 izlemiş, 45000 saat video kayıtlarıyla karıncaların standart günlük yaşamı incelenmiştir, Video gözlemleri ve yerel depremlerin meydana gelme zamanları, karıncaların depremden önceki davranış saatlerinde bir değişiklik olduğunu göstermiştir. 2.1-2.3 şiddetindeki depremlerin oluşumundan önceki gece karıncalarda koloninin yuva içi ve dışı trafiği değişmiş,geceyi her türlü tehdiye rağmen dışarda geçirmişler, rutin yaşamları bozulmuş, depremden sonraki gün normale dönmüştür (Berberich ve ark. 2013).Van depreminde de üçüncü kattaki evime karınca dolmuş, mutfak duvarı üzerinden çatıya doğru tırmanmışlar.

## Kurbağa ve Deprem

Aşırı basınç altındaki kaya kütlelerinin kimyasal değişimini inceleyen NASA, L'Aquila'daki kurbağaların topluca göç edişinin bununla bir bağlantısı olup olmadığını gölün su numunelerini tahlil ederek araştırdı. NASA'da çalışan jeofizikçi Friedmann Freund, tektonik tabakaların yol açtığı türden muazzam bir basınç altında kalan kayaların, deprem öncesinde çevrelerine elektrik yüklü parçacıklar saldıgını kanıtladıklarını söylüyor. Yüze kadar çıkan bu parçacıklar hava veya su ile karşılaşınca reaksiyona girerek yeni moleküllerin oluşumuna neden oluyor. Örneğin suya karışınca ortaya hidrojen peroksit çıkabiliyor. Veya İyonlar, su ile etkileşim halinde olan kayaların yüzeyine ulaştıkları zaman, oksijen molekülü gibi hareket ederler ve su molekülünü oksidasyona uğratırlar. Bu durumda H<sub>2</sub>O molekülünden bir tane H kopartılır ve OH negatif iyonu açığa çıkar ve bu çok güçlü bir etkiye sahip olur. Hava ile etkileşimde olan kayalarda, iyonlar havaya geçerek ondan bir elektron koparırlar ve sonuçta iyonosfere pozitif iyonlar göndermiş olurlar. Su ile etkileşimde olan kayalarda ise, H<sub>2</sub>O'dan H koparan iyonlar maddeyi OH radikaline dönüştürürler ki böylece madde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'ye dönüşmüş olur (Grant ve ark. 2011).

Kurbağaların yaklaşmakta olan bir depremi hissedebildikleri ve sismik faaliyetlerin başlamasından önce kolonilerinden kaçtıkları görülmüştür. Kanıt, üreme kolonilerini 2009'da İtalya'da L'Aquila'yı vuran depremden üç gün önce terk eden bir kurbağa popülasyonundan gelmiştir. 6.3 büyüklüğünde şiddetli bir deprem, L'Aquila kentinin yakınında, Roma'nın kuzey doğusunda yaklaşık 95km (60 mil) meydana geldi. Bu depremin olduğu sırada Bufo bufo kurbağalarının çeşitli kolonilerinden göle çiftleşmeye gelen kurbağaları 2,5 km uzunluğunda bir alanda sayılıp günlük üremeleri çalışıyordu. Araştırmacılar depremden önce, sırasında ve sonrasında İtalya'nın merkezindeki San Ruffino Gölü'nde 29 günlük bir süre dahil davranışlarını inceleyip kara kurbağalarının garip davranışlar not edilmekteydi. Nitekim depremden altı gün öncesine kadar bölgede üreme tespit edilmiş, depremden beş gün önce üreme kolonisindeki erkek ortak kurbağaların sayısı % 96 azalmış ve yine deprem sonrası altı günlük artçı deprem döneminde herhangi bir yumurtlama saptanmamıştır (Grant ve Conlan 2013).

Kurbağaların çevre sıcaklık değişimine hassas oldukları

biliniyordu ama bölgedeki sıcaklıkta değişim saptanmadı. VLF (100 ila 10 kilometre arasındaki dalga boylarına karşılık gelen 3 ila 30 kilohertz (kHz) aralığı ses kayıtları) ve ULF (0.1 Hz den daha düşük) Rusya Bari ve İngiltere üçgenindeki uydular aracılığı ile tespit edilip iyonosfer değişimleri öğrenildi. Deprem alanında düzensizlikler saptanırken İtalya'nın diğer bölgelerinde değişim yoktu. Zaten iyonosferdeki değişim sırasında kurbağalar da çiftleşme yerlerinde bulunmuyordu. Kurbağalar bu değişikliği hissedip telef olma oranını azaltmak, deprem yan hasarlarından korunmak için yükseklerle çıkmış olduğundan depremden 3 gün önce çiftleşme oranı 0 sıfır olarak saptandı. 30 Martta son yumurtlama gözlenmiş, deprem süresince 5-13 Nisan 2009 arası hiç yumurtlama olmamıştır. P dalgasını depremden dakika ve saniyeler önce fark eden kurbağalar 5 gün önce huy değiştirmişlerdir. Araştırmacılar sundukları çalışmayı, deprem öncesi, sırası ve sonrasında hayvan davranışını belgeleyen ilk belgelerden biri olarak nitelendirmişlerdir. Kurbağaların daha yüksek zemine kaçmalarının nedeni de muhtemelen kaya düşmelerinden, toprak kaymalarından ve taşkınlardan daha az risk alma güdülerini tanımlamışlardır. Deprem öncesi meydana gelen elektromanyetik değişimler hayvanlar tarafından filtrelenerek algılanmakta ve içgüdüsel olarak yorumlanmaktadır. Bu yüzden hayvanlar depremin öncüsü olan bu ipuçlarını değerlendirerek pozisyon almakta ve hayatta kalmayı başarabilmektedirler (Grant ve Conlan 2013)

Daha önce İstanbul'daki Ulusal Biyokimya Kongre'mizde söylediğim gibi Veteriner Hekimlerin Biyoterorizm ve Biyogüvenlikte en önemli görevi üstlenen meslek olması yanında ,Biyokimyacı olarak bizler tesadüfi olarak olsa bile, yukarıda sunulan bazı biyokimyasal parametrelerdeki değişimleri saptayarak depremin önceden tahmin edilmesinde de yardımcı olabiliriz.

## KAYNAKLAR

- Anon, (2013). Italy – Hundreds of dead mice found in earthquake area <http://iceagenow.info/2012/06/italy-hundreds-dead-mice-earthquake-area/> (Erişim tarihi: 27 Mayıs 2013).
- Berberich G, Berberich M, Grumpe A, Wöhler C, Schreiber U. (2013). Early results of three-year monitoring of red wood ants' behavioral changes and their possible correlation with earthquake events. *Animals (Basel)*. 3(1):63-84.

- Bluestone JR. (2010). Why the earth Shakes: Pre-modern understanding and modern earthquake science. Ph.D. Thesis, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA,
- Brace WF, Paulding BW, Jr Scholz C. (1966). Dilatancy in the fracture of crystalline rocks. *J. Geophys. Res*, 71, 3939-3953.
- Evernden, JF.(1977). Abnormal animal behaviour prior to earthquakes, Proc. Conference I, Menlo Park.
- Freund F, Stolc V. (2013). Nature of pre-earthquake phenomena and their effects on living organisms, *Animals*, 3, 513-531
- Freund FT. (2010). Toward a unified solid state theory for pre-earthquake signals. *Acta Geophys*. 58, 719-766
- Ganguly ND. (2009). Variation in atmospheric ozone concentration following strong earthquakes. *Int. J. Remote Sens.*, 30, 349-356
- Grant RA, Conlan H. (2013). Article frog swarms: earthquake precursors or false alarms? *Animals*, 3, 962-977;
- Grant RA, Halliday T, Bladerer WP, Leuenberger F, Newcomer M, Cyr G, Freund FT.(2011). Ground water chemistry changes before major earthquakes and possible effects on animals. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 8, 1936-1956.
- Kotelevtsev Y, Holmes MC, Burchell A, Houston PM, Schmoll D, Jamieson P, Best R, Brown R, Edwards CR, Seckl JR, Mullins JJ. (1997). 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 knockout mice show attenuated glucocorticoid-inducible responses and resist hyperglycemia on obesity or stress. *Proc Natl Acad Sci USA*;94:14924 - 9
- Krasnogorskaya NV, Protasov VR, Kharybin EV. et al.(1984). Living-systems on the service of earthquake prediction, in *Electromagnetic Fields in Biosphere I "Nauka", Moscow*, pp. 315-325
- Krueger AP, Reed EJ. (1976). Biological impact of small air ions. *Science* , 193, 1209-1213.
- Lee WHK, Ando, M, Kautz WH. (1976). A Summary of the Literature on Unusual Animal Behavior Before Earthquakes." In *Abnormal Animal Behavior Prior to Earthquakes*. J.F.Evernden (ed.), National Earthquake Hazards Reduction Program, USGS, Menlo Park, CA, 23-24, 15-54.
- Lloyd D, Murray DB. (2006). The temporal architecture of eukaryotic growth. *FEBS Lett*. 580, 2830-2865.
- Logan, JM. (1977). Animal behaviour and earthquake prediction. *Nature*, 265, 404-405
- Lu-Lu Chen, Xiang Hu, Juan Zheng, Hao-Hao Zhang, Wen Kong, Wei-Hong Yang, Tian-Shu Zeng, Jiao-Yue Zhang, Ling Yue. (2010). Increases in energy intake, insulin resistance and stress in rats before Wenchuan earthquake far from the epicenter *Experimental Biology and Medicine*; 235: 1216
- Nakamoto RK, Baylis Scanlon JA, Al-Shawi MK. (2008). The rotary mechanism of the atp in synthase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 476, 43-50.
- Nikonov AA. (1991). Destructive historical earthquakes in Soviet Armenia, *Tectonophysics* 193,225- 229.
- Nikonov AA.(1981). Abnormal animal behaviour as earthquake precursors, 'VINITI', Moscow, Dep. 4316-81, 54
- Ritz T. (2011) Quantum effects in biology: Bird navigation. *Proc. Chem.*, 3, 262-275
- Turcotte, DL. (1991) Earthquake prediction. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 19, 263-281
- Tyrtyshevin AV. (1996). The variations of ozone content in the atmosphere above strong earthquake epicenter. *Phys. Solid Earth*, 31, 789-794.
- Ulomov VI, Mavashev BZ. (1971). The Tashkent Earthquake of 26 April, 1966. *Acad. Nauk. Uzbek SSR FAN*, 188-192.
- Varon J, Marik PE. (1997). Carbon monoxide poisoning. *Int. J. Emerg. Intens. Care Med.*, 1, doi: 10.5580/1943.



## Liver Tissue Adenosine Deaminase Enzyme Activity in *Hypericum Perforatum* Applied Ehrlich Acid Solid Tumor Bearing Mice

Saadet Nur MUTLU<sup>1</sup>, Burcu Menekşe BALKAN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Health Science, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, TURKEY

<sup>2</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, TURKEY

### ABSTRACT

Drugs used in cancer treatment have serious side effects in patients. For this reason, studies are being carried out on the development of herbal based drugs that can be used in the treatment of cancer without side effects. It has been reported that there is an important relationship between carcinogenic process and activation of some enzymes in breast cancer and ADA activity may increase or decrease in cancer tissues and cells. The aim of this study is to investigate the effects of aqueous extract of *H. perforatum* on liver tissue ADA enzyme activities in breast cancer-induced mice. In the study, mice divided into five groups; healthy control group (Group 1, n = 8), cancer control group (Group 2, n = 9), low-dose *H. Perforatum* (group 3, n = 8), high-dose *H. Perforatum* (group 4, n = 11) and doxorubicin (Group 5, n = 12). Liver tissue ADA activity increased in Group 2 compared to Group 4 (P <0.05).

**Key words:** Adenosine deaminase, Cancer, *Hypericum perforatum*, Mice.

## *Hypericum Perforatum* Uygulanan Ehrlich Asit Solid Tümör Oluşturulmuş Farelerde Karaciğer Dokusu Adenozin Deaminaz Enzim Aktivitesi

### ÖZET

Kanser tedavisinde kullanılan ilaçlar hastalarda ciddi yan etkiler meydana getirmektedir. Bu sebeple kanseri tedavisinde kullanılabilecek, yan etkileri olmayan bitkisel kaynaklı ilaçların geliştirilmesi konusunda çalışmalar yapılmaktadır. Meme kanserinde karsinojenik süreç ve bazı enzimlerin aktivasyonu arasında önemli bir ilişki olduğu, kanser doku ve hücrelerinde ise ADA aktivitesinin artabileceği ya da azalabileceği bildirilmiştir. Bu çalışmada kanser tedavisinde kullanımları antioksidan etkileri bilinen *H. Perforatum*'un sulu ekstratının meme kanseri oluşturulan farelerde, karaciğer dokusu ADA enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada deney hayvanları, sağlıklı kontrol grubu (Grup 1, n=8), kanserli kontrol grubu (Grup 2, n=9), düşük doz *H. Perforatum* (grup 3, n=8), yüksek doz *H. Perforatum* (grup 4, n=11) ve Doksorubisin (Grup 5, n=12) uygulanan gruplar olmak üzere beş gruba ayrıldı. ADA aktivitesi, Grup 2'de Grup 4'e göre arttığı (P<0.05) tespit edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Adenozin Deaminaz, Fare, *Hypericum perforatum*, Kanser.

## GİRİŞ

Memekanseri tedavisinde kullanılan ilaçlar hastalarda ciddiyan etkiler meydana getirmektedir (Guo-Shiou Liao ve ark. 2013). Bu sebeple meme kanseri tedavisinde kullanılabilen, yan etkileri olmayan birçok tıbbi bitkinin etkileri araştırılmaktadır. Bu sebeple mevcut farmakolojik çalışmalar moleküler hedeflere yönelik anti-kanser ilaçların geliştirilmesi üzerinde durmaktadır. Üretilen ilaçların yaklaşık %20'si geleneksel tıbbi bitkiler kullanılarak hazırlanmaktadır. Bu bitkilerden çok fazla sayıda bileşik izole edilmiştir. Bu bileşikler başta kanser olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların hazırlanmasında etken madde olarak kullanılmaktadır (Robinson ve Zhang 2011; Rogers 2005).

Dünyada 465 tür içeren *Hypericum L. (Guttiferae / Clusiaceae / Hypericaceae)* türü, potansiyel tıbbi değere sahip geniş bir bitki familyasıdır (Nogueira ve ark. 2008). *Hypericum perforatum*, ağırlıklı olarak depresyon tedavisinde kullanımından dolayı içindeki etken maddeler araştırılmıştır. Yaygın olarak St. John's wort, sarı kantaron, binbirdelik otu olarak bilinir (Robson 1977).

Kimyasal araştırmalarda *Hypericum Perforatum*'da yapısında, naftodiantronlar, floglolüsünoller ve flavonoidler (fenilpropanlar, flavonol glikozitler ve biflavonlar gibi) ve uçucu yağlar bulunur. Bu bileşenlerden iki ana aktif bileşen belirlenmiştir. Bunlar; hiperisin (bir naftodianthrone) ve hiperforin (bir floroglukinol)'dir. Hiperforin ve hiperisin antikanser özellikleri açısından incelendiğinde, hiperforinin in vitro tümör hücre büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir. Hiperisin ayrıca gliom, nöroblastoma, adenom, mezotelyoma, melanom, karsinoma, sarkom ve lösemi gibi çeşitli neoplastik dokularda hücrelerin büyümesini engellemiştir (Fox ve ark. 1998). Tümör hücrelerinde hiperisinle birlikte lazer uygulamaları, insan prostat kanseri hücrelerinde (Colasanti ve ark. 2000), insan mesane karsinom hücrelerinde (Kamuhabwa ve ark. 2000) ve pankreatik kanser hücrelerinde (Liu ve ark. 2000) toksik etkilere neden olduğu bildirilmektedir.

Kanser oluşumu incelendiğinde pürin ve pirimidin metabolizması büyük önem taşımaktadır. Pürin ve pirimidin metabolizmasında ve bu metabolizmalarda yer alan enzimlerin aktivitelerindeki değişiklikler kanser çalışmalarında incelenmektedir. Genel görüş kanserli hücrede pürin-

pirimidin metabolizmasında de-novo sentaz ve salvaj ara yolunda görev alan enzim aktivitelerinin arttığı, yıkım yolu enzim aktivitelerinin ise azaldığı yönündedir (Camici ve ark. 1990; Sufirin ve ark. 1978)

Kanser hücrelerinde DNA turn-over'inin çok yüksek olması, salvaj ara yoluna gerekli olan substratların çok fazla miktarda oluşmasına yol açar. Gerçekten kanser hücresinde metabolik yolda görev alan enzimlerin aktivitelerinin de büyük oranda arttığı tespit edilmiştir. Bu ara yolda görev alan enzimlerin en önemlilerinden biri Adenozin deaminaz (ADA)'dır (Durak ve ark. 1994; Durak ve ark. 1996).

ADA pürin bazların yıkımıyla ilgili olan ve adenozinin amin molekülünü kopararak inozine dönüşmesini sağlayan bir enzimdir. ADA özellikle adenozin yıkımında rol aldığı ve salvaj yoluna substrat sağladığı için bazı yazarlar tarafından pürin salvaj yolu enzimi olarak düşünülmüştür. Özellikle hücre siklusu hızlanmış olan kanser hücresinin DNA sentezi için normal hücreye göre daha fazla nükleotide ihtiyaç vardır. Pürin nükleotidlerinin yeniden elde edilmesinde ise en avantajlı yol pürinlerin salvaj yoludur. Kanser hücrelerinde bu yolu kontrol eden esas enzimlerden olan hipoksantin-guanin fosforibosil transferaz enziminin yanı sıra 5'nükleotidaz ve ADA'nın aktivitesinin normale göre arttığı birçok araştırmada gösterilmiştir. Buna karşılık bazı araştırmacılar ise ADA'yı yıkım yolunun bir enzimi olarak değerlendirmektedir. Kanser hücrelerinde pürin yıkım yolunun baskılanıp salvaj yolunun arttırılması çok karakteristik davranıştır. Değişik kanser türlerinde ADA aktivitesini düşük olarak bulan araştırmacılar ise bu durumu yıkım yolunun baskılanması çabasına bir örnek olarak değerlendirmişlerdir (Durak ve ark. 1993).

Antioksidanların kanserden koruyucu etkinliği birçok çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmada ise antioksidan etkileri bilinen *Hypericum perforatum*'un sulu ekstratının meme kanseri oluşturulan farelerde, karaciğer ADA enzim aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

Deney hayvan çalışmaları 19.01.2018 tarihli ve 18 nolu Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu kararına uygun olarak yapılmıştır.

Çalışmada Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney

Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilen, toplam 48 adet, 12-16 haftalık, ağırlıkları 25-40 g arasında değişen Balb-c dişi fare kullanıldı. Fareler, özel poliprotilen kafeslerde her bir grupta 8-11 adet fare, her bir kafeste yaklaşık 4-6 fare olacak şekilde, kontrollü şartlarda (12 saat karanlık/12 saat aydınlık), standart fare yemi ve normal musluk suyu ile ad libitum olarak beslendi.

Çalışmada meme tümör modeli oluşturmak amacıyla Ehrlich asit tümör hücreleri kullanıldı. Hücreler, daha önce intraperitoneal enjeksiyon yolu ile tümör geliştirilmiş olan donör farenin asit sıvısından sağlandı. Enjektör yardımıyla donör farenin periton boşluğundan, Ehrlich asit tümör hücrelerinin bulunduğu asit sıvısı alınarak Thoma lamında hücre sayımı yapıldı. Uygun hücre sayısı hesaplanarak Grup 1 (sağlıklı kontrol grubu) dışında, diğer gruplardaki farelere katı tümör oluşturmak üzere  $2.5 \times 10^6$  EAC hücre içeren asit sıvısı sırt bölgesine subkutan yolla enjekte edildi. Grup 1'deki farelere ise subkutan yolla % 0.9'luk NaCl uygulandı. EAC hücreleri uygulandıktan sonra fareler tartıldı ve rastgele olarak gruplara ayrıldı.

Grup 3 ve 4'teki farelere farklı dozlarda hazırlanan *Hypericum perforatum* sulu ekstraktı, diğer gruplarda bulunan hayvanlara ise içme suyu (normal beslenmeye ek olarak) 14 gün boyunca gün aşırı olarak gavaj ile uygulandı.

Tümör uygulamasından sonraki 2. 7. ve 12. günlerde grup 5'de bulunan farelere Doxorubicin (3 mg/kg), diğer gruplardaki farelere ise % 0,9'luk NaCl toplam 3 kez intraperitoneal olarak uygulandı.

H. perforatum standartize ( 300mg St John's Wort, 0,5 mg -% 0,3 - hiperisin) *Hypericum perforatum* (St. John's Wort *Hypericum perforatum* SOLGAR®) ekstraktı kullanılarak uygun dozlarda %0,9'luk NaCl içerisinde hazırlandı.

Tümör uygulamasından sonraki 15. günde hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon için yüksek dozda ksilazin (Rampun®) ve ketamin (ketasol®) kas içine uygulandı. Alınan karaciğer örnekleri % 0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra kurutma kağıdında kurulandı ve alınan karaciğer doku örnekleri çalışma yapılıncaya kadar derin dondurucuda (-20oC'de) saklandı. Dokular fosfat tampon (pH 6.5) ile 1/10 oranında sulandırılarak buz üzerinde homojenize (Wisetis homojenizatör, 50kHz/15sn) edildi.

#### Adenozin Deaminaz Ölçüm Metodu

ADA enzim aktivitesi Guisti(1974) tarafından bildirilen yöntemle ölçüldü. ADA, adenozinden inozin oluşumunu katalize eder. Bu reaksiyon sonucunda amonyak açığa çıkmaktadır. Açığa çıkan amonyak, sodyum nitroprussid ve alkali ortamda fenol çözeltisiyle mavi renkli indofenol bileşiğine dönüşmektedir. Bu reaksiyonda sodyum nitroprussid katalizör olarak görev yapmaktadır. Amonyak konsantrasyonu oluşan indofenol ile doğru orantılıdır.

Örneklerin protein içerikleri Lowry yöntemine göre tayin edildi (Lowry ve ark. 1951).

#### BULGULAR

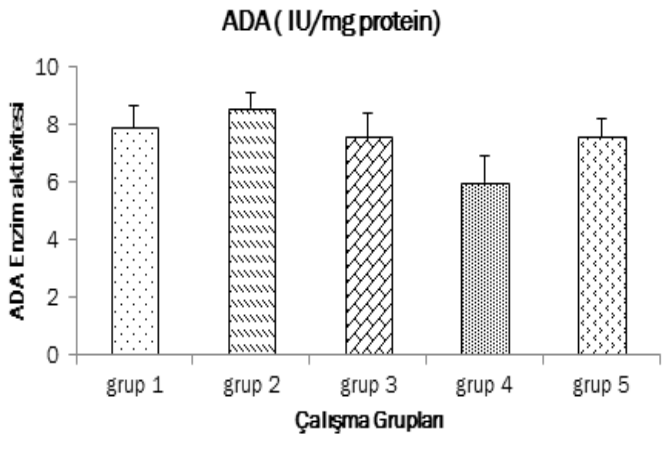
Karaciğer dokularındaki ADA aktivitesi, en yüksek, kanserli kontrol grubunda (Grup 2), en düşük ise yüksek doz *Hypericum perforatum* uygulanan farelerde (Grup 4) bulunmuştur. Düşük doz *Hypericum perforatum* uygulanan grupta ADA aktivitesi, yüksek doz *Hypericum perforatum* uygulanan gruba göre daha yüksek, herhangi bir uygulama yapılmayan gruba göre ise daha az bulunmuştur. Düşük doz *Hypericum perforatum* uygulanan grup (grup 2), sağlıklı grup (Grup 1) ve doksorubisin uygulana gruplarda (Grup 5) ise benzer düzeyler ölçülmüştür. Bu değişimlerden Grup 2 ve grup-4 arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunurken ( $P < 0.05$ ), diğer gruplar arasındaki fark anlamlı değildir.

**Tablo 1.** Deneysel gruplarında ADA Enzim Aktiviteleri

Gruplar	ADA Enzim Aktivitesi
Grup 1	7.90±0.77 <sup>ab</sup>
Grup 2	8.59±0.54 <sup>a</sup>
Grup 3	7.6±0.82 <sup>ab</sup>
Grup 4	6.02±0.91 <sup>b</sup>
Grup 5	7.58±0.62 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Farklı harflerle belirtilen değerler arasındaki farklılık istatistik olarak önemlidir ( $p < 0.05$ )

Bu çalışmada, karaciğer dokusu ADA enzim aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna kıyaslandığında, meme tümörü oluşturulan kontrol grubunda artmış; yüksek doz (900 mg/kg) *Hypericum perforatum* uygulanan grupta azalmıştır.



**Şekil 1.** Farklı dozlarda *Hypericum perforatum* uygulanan, EAC oluşturulmuş farelerin karaciğer dokularında ADA enzim aktivitesi

Düşük doz (300 mg/kg) *Hypericum perforatum* ve doksorubisin uygulanan gruplarda ise azalma olmakla birlikte, anlamlı bir değişiklik görülmemiştir.

### TARTIŞMA

Aghaei ve ark. (2005), meme kanserinde serum ve tümör dokularında ADA aktivitesinin artmış olduğunu bildirmişlerdir. Canbolat ve ark. (1996) ise meme kanserinde tümör dokusundaki ADA aktivitesini sağlıklı dokulardan yüksek bulmuşlardır. Bir başka çalışmada, meme kanserli hastalarda serum ADA aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Walia ve ark. 1995). Artmış ADA aktivitesinin, tümörün evlendirilmesi, tümör büyüklüğü, lenf nod tutulumu ve yaş ile ilişkili olduğu; bu sebeple, artmış ADA aktivitesinin tümör dokusundan farklı kaynaklara bağlı olabileceği bildirilmiştir (Aghaeia ve ark. 2005).

Avcı ve ark. (2005), antioksidan (allium-sativum ve trifolium-pratense) ekstraktlarının takviyesinin kanserli ve kanserli olmayan karaciğer dokularında ADA aktivitesini incelemişlerdir. Kullanılan antioksidan ekstrakt her iki grupta da ADA aktivitesini belirgin olarak inhibe etmiştir.

ADA aktivitesinin araştırıldığı kanser doku ve hücrelerinde çok farklı sonuçlar vardır. Kiozomi ve ark. (1985) cilt kanserlerinde yüksek ADA aktivitesini rapor etmişlerdir. Yine Sufirin ve ark. (1978) safra kesesi kanseri olan hastaların kanser dokularında tespit ettikleri yüksek ADA aktivitelerini bildirmişlerdir. Ancak Durak ve ark. (1993) insan larenks kanserlerinde

ADA aktivitesini komşu sağlam dokuya göre düşük tespit etmişlerdir. Daha önce de belirtildiği gibi malign hücredeki gen yapısının yeniden düzenlenmesi sonucu normal hücredeki enzim profili değişime uğramaktadır. Kanserli hücrelerdeki enzim aktivitelerinin ölçülmesi, değişime uğrayan malign hücredeki yeni düzenlemeler hakkında bizlere bilgi vermektedir. Bu enzim aktivitelerinin artışı veya azalışı, kanser hücresindeki yeniden programlanmış genetik bilginin bir göstergesi olması açısından önemlidir (Dolanmaz 1998).

Benign ovarian tümörlere kıyasla, yumurtalık kanseri olan hastalarda serum ve peritoneal sıvı ADA düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır ( $p = 0.001$ ). Buna ek olarak, yumurtalık kanserlerinin histopatolojik alt tipleri ve derecesine göre ADA düzeyleri önemli ölçüde farklı bulunurken, iyi huylu ve düşük dereceli habis tümörler arasındaki ADA düzeyleri bakımından anlamlı farklılık tespit edilmemiştir. Aynı çalışmada peritoneal sıvı ile serum ADA düzeyleri arasında önemli bir ilişki olduğu, malign over tümörlerinde serum ve peritoneal sıvı ADA düzeyleri daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Hatta bu bulgularla ADA'nın, yumurtalık tümörlerinin tanı ve tedavisinde yararlı bir biyobelirteç olabileceği öne sürülmüştür (Urunsak ve ark. 2012).

Meme kanserli hastalarda yapılan çalışmada ADA aktivitesi hasta grubunda Evre-1, Evre-2 ve Evre-3' de yüksek saptanmış ( $p < 0.001$ ) ve ADA aktiviteleri hasta grubu evrelerinde sırasıyla, Evre-1 ile Evre-2 ve Evre-1 ile Evre-3 arasında herhangi bir istatistiksel anlamlılık yokken, Evre-2 ile Evre-3 arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.001$ ) (Demir 2017).

Canbolat ve ark. (1996) meme kanseri tümörlerinde ADA aktivitesinin normal dokudan daha yüksek olduğunu gösterirken, Walia ve ark. (1995) da, meme kanserli hastaların serumunda artmış toplam ADA aktivitesi tespit etmişlerdir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, postmenopozal yaş ile ilgili olarak hem toplam ADA hem de ADA2 izoenzimi aktivitelerinin meme kanserli hastaların serumunda arttığını ortaya koymaktadır (Aghaeia ve ark. 2005).

Serum ADA seviyelerinin çeşitli kanser türlerinde yaklaşık bir ila üç kat arttığı gösterilmiştir. Mevcut çalışmadaki veriler, baş-boyun kanserli hastalarda serum ADA düzeylerinin kontrollere kıyasla yaklaşık %150 oranında arttığını

göstermektedir. Malignitede serum ADA aktivitesinde artış, artmış adenozin metabolizmasını akla getirmektedir (Mishra ve ark. 2000).

Ishii ve Green (1973) adenozinin, kültürlenmiş memeli hücreleri için toksik olduğunu ve pirimidin biyosentezine müdahale ettiğini bildirmiştir. Mishra ve ark. (2000), ise yaptıkları çalışma sonucunda ADA aktivitesindeki artışın doğrudan kanser evresi ile ilişkili ve artışın primer tümör kitlesi ile doğru orantılı olduğunu göstermişlerdir. Benzer şekilde Sufrin ve ark. (1978), mesane geçiş hücreli karsinomali hastalarda lenfosit ADA aktivitesindeki artış ile tümör evresi arasında anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmiştir.

Bazı araştırmacılar, ameliyattan sonra akciğer karsinomali hastalarda serum ADA düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını bildirmiştir (Nishihara ve ark. 1970; Sufrin ve ark. 1978). Nishihara ve ark. (1970), radyoterapiye tabi tutulmuş hastaların serum ADA aktivitesinde düşüş gösterdiklerini bildirmiştir. Radyoterapi tamamlandıktan sonra, ADA aktivitesinde yaklaşık %85 azalma görüldüğünü bildirmişlerdir.

ADA, özellikle T hücreleri başta olmak üzere lenf hücrelerinin farklılaşması için gerekli ve monositlerin makrofajlara dönüşmesinde önemli rol oynamaktadır (Shore ve ark. 1981). İntraselüler enfeksiyon ve yangısal hastalıklarda oluşan monosit/makrofaj aktivasyonu, ADA'nın salınımının artmasına ve serum düzeyinin yükselmesine neden olur. Yangısal hastalıklarda, dokularda meydana gelen yangı ve aktive olan makrofajlardan salınan serbest radikallerin oksidatif strese neden olabileceği bildirilmiştir (Wiid ve ark. 2004).

Yapılan çalışmada, karaciğer dokusu ADA enzim aktivitesi sağlıklı kontrol grubuna kıyaslandığında, meme tümörü oluşturulan kontrol grubunda artmış; yüksek doz (900 mg/kg) *Hypericum perforatum* uygulanan grupta azalmıştır. Düşük doz (300 mg/kg) *Hypericum perforatum* ve doksorubisin uygulanan gruplarda ise azalma olmakla birlikte, anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Tez çalışmasında kanserli kontrol grubunda elde edilen veriler Aghaei ve ark. (2005) ve Canbolat ve ark. (1996) ile benzer bulunmuştur.

Durak ve ark. 1994, ise meme kanserli ve mesane kanserli hastalarda kanser dokusunda ADA aktivitesinin artmış, larenks kanserli hastaların kanserli dokularında bu enzim

aktivitesin düştüğünü bildirmişlerdir (Durak ve ark. 1994).

Yine aynı şekilde Avcı ve ark. (2005)'nin antioksidan olan (*allium-sativum* ve *trifolium-pratense*) ekstraktlarının takviyesinin kanserli ve kanserli olmayan karaciğer dokularında ADA aktivitesini inceledikleri çalışmada, tez çalışmasıyla benzer olarak, kullanılan antioksidan ekstraktın her iki grupta da ADA aktivitesini belirgin olarak inhibe ettiğini bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Hızlı büyümekte olan kanser hücrelerinde artmış ADA aktivitesi beklenen bir sonuçtur. ADA aktivitesinin bu hücrelerde düşürülmesi, kanser hücrelerinin hızlı büyümesinin baskılanmasıyla ilgili olabilir.

Düşük doz *H.perforatum* uygulanan grupta ise yüksek doz uygulanan gruba göre ADA enzim aktivitelerinde meydana gelen farklılık uygulanan dozun kanserli dokularda enzim aktivitelerini farklı derecelerde etkilemesinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

## TEŞEKKÜRLER

Bu çalışma, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kordinatörlüğü (0528-YL-18) tarafından desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Aghaeia M, Karami-Tehrana F, Salamia S, Atrib M. (2005). Adenosine Deaminase Activity in the Serum and Malignant Tumors of Breast Cancer: The Assessment of Isoenzyme ADA1 and ADA2 Activities. *Clin Biochem*, 38: 887-891.
- Avcı A, Kaçmaz M, Kavutcu M, Göçmen E, Durak I. (2005). Effects of on Antioxidant Extract on Adenosine Deaminase Activities in Cancerous Human Liver Tissues. *International Journal of Cancer Research*, 1(1-2): 53-56.
- Camici M, Tozzi MG, Allegrini S. (1990). Purine Salvage Enzyme Activities in Normal And Neoplastic Human Tissues. *Can Biochem Biophys*, 2: 201-9
- Canbolat O, Durak I, Cetin R, Kavutcu M, Demirci S, Ozturk S. (1996). Activities of adenosine deaminase, 5V-nucleotidase, guanase and cytidin deaminase enzymes in cancerous and noncancerous human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 37: 189-93.
- Colasanti A, Kisslinger A, Liuzzi R, Quarto M, Riccio P,

- Roberti G, Tramantano D, Villani F. (2000). Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. *J Photochem Photobiol*, 54: 103-7.
- Demir H, Keskin S, Demir C, Gökyer H. (2017). Meme Kanseri Teşhisi ve Evrelerini Belirlemede Bazı Enzimlerin Tanısal Performansını ROC (Receiver Operating Characteristics) Eğrisi ile Değerlendirilmesi, [http://medikalfizik.org/uploads/files/15\\_mfd\\_kongre/17mayis\\_30\\_halitdemir.pdf](http://medikalfizik.org/uploads/files/15_mfd_kongre/17mayis_30_halitdemir.pdf) Erişim Tarihi: 15.11.2017.
- Dolanmaz D (1998). Kanseroz Ve Non- Kanseroz Bas-Boyun Bölgesi Dokularında Adenozin Deaminaz Enzim Aktivitesinin İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Tezi, Ankara
- Durak I, Işık ACÜ, Canbolat O, Akyol Ö, Kavukçu M. (1993). Adenosine Deaminase, 5' Nucleotidase, Xanthine Oxidase, Superoxide Dismutase And Catalase Activities In Cancerous And Non- Cancerous Human Laryngeal Tissues. *Free Radical Bio Med*, 15(6): 681-684.
- Durak I, Işık AU, Canbolat O, Akyol O, Kavutçu M. (1994). Adenosine deaminase, 5V-nucleotidase, xanthine oxidase, superoxid dismutase, and catalase activities in cancerous and noncancerous human bladder tissues. *Free Radical Biol Med*, 16: 825- 31.
- Durak I, Çetin R, Canbolat O, Çetin D, Yurtaslanı Z, Ünal A. (1996). Adenosine Deaminase, 5' Nucleotidase, Guanase And Cytidine Deaminase In Gastric Tissues From Patients With Gastric Cancer. *Cancer Lett*, 84(2): 199- 202.
- Fox FE, Niu Z, Tobia A, Rook AH. (1998). Photoactivated hypericin is an anti- proliferative agent that induces a high rate of apoptotic death of normal, transformed, and malignant T lymphocytes: Complications for the treatment of cutaneous lympho- proliferative and inflammatory disorders. *J Invest Dermatol*, 111(2): 327-32
- Giusti, G. (1974) Adenosine Deaminase. In: Bergmeyer, H.U., Ed., *Methods of Enzymatic Analysis*, 2nd Edition, Academic Press, New York, 1092-1099.
- Guo-Shiou Liao GS, Apaya MK, Shyr LF. (2013). Review Article Herbal Medicine and Acupuncture for Breast Cancer Palliative Care and Adjuvant Therapy. *Evid.-Based Complementary Altern. Med.* Article ID 437948, 17.
- Ishii A. And Green H. (1973). Lethality Of Adenosine For Cultured Mammalian Cells By Interference With Pyrimidine Biosynthesis. *J. Cell Sci.*, 13: 419-439.
- Kamuhabwa AR, Agostinis P, D'Hallewin MA, Kasran A, De Witte PA. (2000). Photodynamic activity of hypericin in human urinary bladder carcinoma cells. *Anticancer Res*, 220: 2579-84
- Koizumi H, Lizuka H, Aoyagi T, Miura Y. (1983). Adenosine Deaminase In Epidermis From Healty And Psoriatic Subjects. *Arch Dermatol Res*, 275: 310-4
- Liu CD, Kwan D, Saxton RE, McFadden DW. (2000). Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and vivo. *J Surg Res*, 93: 137-43
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biochem.*, 193: 265-275.
- Mishra R, Agarwal MK, Chansuria JPN. (2000). Serum Adenosine Deaminase Levels As An Index Of Tumor Growth In Head And Neck Malignancy. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 52(4): 360-363.
- Nishihara H, Akedo H, Okada H. (1970). Multienzyme Patterns Of Serum Adenosine Deaminase By Agar Gel Electrophoresis: An Evaluation Of The Diagnostic Value In Lung Cancer. *Clin Chim Acta*, 30: 251-8
- Nogueira T, Marcelo-Curto MJ, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Rubiolo P, Bicchì C (2008). Chemotaxonomy of *Hypericum* genus from Portugal: Geographical distribution and essential oils composition of *Hypericum perforatum*, *Hypericum humifusum*, *Hypericum linariifolium* and *Hypericum pulchrum*. *Biochem Syst Ecol.* 36(1): 40-50.
- Robinson MM, Zhang X. (2011). *The World Medicines Situation 2011. Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges*. Geneva: World Health Organization.
- Robson NKB. (1977). *Studies in the genus Hypericum L. (Guttiferae). I. Infrageneric classification.* 5: 293.
- Rogers G. (2005). *Herb Consumers' Attitudes, Preferences Profiled in New Market Study*. *HerbalGram American Botanical Council*, 65: 60-61.
- Shore A, Dosch HM, Gelfand EW. (1981). Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin Exp Immunol.* 44: 152-155.
- Sufrin G, Tritsch GL, Mittelman A, Murphr GP. (1978). Adenosine Deaminase Activity In Patients With Carcinoma of Bladder.

J Urol, 119: 343-6.

Urunsak IF, Küçükgöz-Güleç U, Paydaş S, Seydaoğlu G, Güzel A B, Vardar MA. (2012). Adenosine Deaminase Activity in Patients With Ovarian Neoplasms. Arch Gynecol Obstet, 286: 155-159.

Walia M, Mahajan M, Singh K. (1995). Serum adenosine deaminase, 5nucleotidase and alkaline phosphates in breast cancer patients. Indian J Med Res. 101: 247-9.

Wiid I, Seaman T, Hoal EG, Benade AJ, Van Helden PD. (2004). Total antioxidant levels are low during active TB and rise with antituberculosis therapy. IUBMB Life. 56: 101-106.

## Investigation of Blood and Milk Selenium Status with the Related Factors in Merino Crossbred Ewes During Lactation

Selçuk PEKKAYA<sup>1</sup>, Pınar PEKER AKALIN<sup>2</sup>, Nuri BAŞPINAR<sup>3</sup>, Miyase ÇINAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Veterinary Control Central Research Institute, Biochemistry Laboratory, Ankara, TURKEY

<sup>2</sup> Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, TURKEY

<sup>3</sup> Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Selçuk University, Konya, TURKEY

<sup>4</sup> Departments of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, TURKEY

### ABSTRACT

This study was aimed to investigate selenium status in Merino crossbred ewes and their lambs by evaluating Se and related biochemical parameters in different districts of Ankara. Merino crossbred ewes and their lambs, obtained from Ankara Polatlı TİGEM farm (Control group) and pasture breeding farmers in Polatlı, Beypazarı and Gölbaşı districts, were used. Milk and blood samples were taken from ewes during the lactation period (1st, 15th and 45th days). Blood samples were taken from lambs at the same days. Feed, water and soil samples were also taken. Selenium, copper, zinc, cadmium levels in feed, water and soil, selenium levels in milk, selenium, copper, zinc, cadmium and Vitamin E levels and aspartate amino transferase, creatine kinase, lactate dehydrogenase and glutathione peroxidase activities in serum, were determined. In ewes, serum and milk selenium levels were lower in Polatlı, Beypazarı and Gölbaşı groups ( $p<0.001$ ), compared to the Control, with the lowest levels in Gölbaşı group in the 1st and 15th days of lactation. In lambs, serum selenium levels in Polatlı and Gölbaşı groups were lower than the Control ( $p<0.01$ ). Vitamin E levels were lower in ewes ( $p<0.001$ ) and lambs ( $p<0.01$ ) in the three regions compared to the Control. When serum aspartate amino transferase and creatine kinase activities were examined, significant increases were found in ewes and lambs regarding the regions, whereas the highest levels were in Gölbaşı group ( $p<0.001$ ) in the lambs. Serum copper levels of ewes from all of the three regions were lower than in the Control group ( $p<0.001$ ) in the following days of lactation. Low levels of milk and serum selenium and serum Vitamin E levels, high activities of AST, CK in sheep from Polatlı, Beypazarı and Gölbaşı regions, mostly in Gölbaşı, suggest that these regions were critical in terms of Se deficiency.

**Key words:** Lactation, Merino Crossbred, Milk Selenium Levels, Selenium deficiency.

## Merinos Melezi Koyunlarda Laktasyonun Farklı Dönemlerinde Kan ve Süt Selenyum Düzeyleri İle Bunlara Etki Eden Faktörlerin Araştırılması

### ÖZET

Çalışmada, selenyum eksikliğinin araştırılmasına yönelik olarak Ankara ilinin farklı ilçelerinde, Merinos melezi koyunlarda ve bunların kuzularında, Se ve ilişkili biyokimyasal parametrelerin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada, Ankara Polatlı TİGEM tarım işletmesinden (Kontrol grubu) ve Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı ilçelerinde mera yetiştiriciliği yapan koyun yetiştiricilerinden elde edilen Merinos melezi koyun ve kuzuları kullanıldı. Koyunlardan laktasyon süresince toplam üç kez (1. 15. ve 45. günlerde) süt ve kan örnekleri, kuzularından belirtilen dönemlerde kan örnekleri alındı. Hayvanların tükettiği yem ve suyun yanı sıra otlatılan meralardan toprak örnekleri de alındı. Alınan yem, su ve toprak örneklerinde selenyum, bakır, çinko, kadmiyum, süt örneklerinde selenyum, serum örneklerinde ise selenyum, bakır, çinko, kadmiyum ve Vitamin E düzeyleri ile aspartat amino transferaz, kreatin kinaz, laktat dehidrogenaz ve glutatyon peroksidad aktiviteyi belirlendi. Koyunlarda, laktasyonun ilerleyen günlerinde (1. 15. ve 45. günlerde) serum ve süt selenyum düzeyleri Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarında, Kontrol'e göre düşük ( $p<0,001$ ) iken, en düşük olduğu grup Gölbaşı grubu (1. ve 15. günlerde) olarak tespit edildi. Kuzularda, Polatlı ve Gölbaşı grubu serum selenyum düzeyleri Kontrol'e göre düşük ( $p<0,01$ ) olarak belirlendi. Vitamin E düzeyleri, hem koyunlarda ( $p<0,001$ ) hem de kuzularında ( $p<0,01$ ) Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarında, Kontrol'e göre düşük olarak belirlendi. Serum aspartat amino transferaz ve kreatin kinaz aktiviteyi incelendiğinde, hem koyunlarda hem de kuzularında, laktasyonun ilerleyen günlerinde, kuzularda Gölbaşı grubu en yüksek ( $p<0,001$ ) olmak üzere, tüm bölgelerde Kontrol'e göre önemli düzeyde yükseklikler tespit edildi. Laktasyonun ilerleyen günlerinde, her 3 bölgeye ait koyunların serum bakır düzeyleri, Kontrol'e göre düşük ( $p<0,001$ ) olarak saptandı. Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı bölgelerindeki koyunlarda süt ve serum selenyum ile serum Vitamin E düzeylerinin düşüklüğü, ayrıca serum AST ve CK aktiviteyi yüksekliği, bu bölgelerin, özellikle Gölbaşı bölgesi olmak üzere, Se yetersizliği yönünden kritik bölgeler olduğunu göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** Laktasyon, Merinos Melezi, Selenyum Eksikliği, Süt Selenyum Düzeyleri.



## GİRİŞ

Selenyum (Se) insan ve hayvan gıdalarında bulunması gereken ve canlıların üreme ve büyümeleri için gerekli olan bir eser elementtir. Doğada elementel Se (Se0), selenid (Se-2), selenit (Se+4) ve selenat (Se+6) şeklinde, organik ve inorganik formlarda bulunur. Genel olarak hayvanlar için toksik düzeylerde Se bulunduran tarım alanları (seleniferöz alanlar) Kuzey ve Güney Amerika, Fas, Cezayir, İspanya, Bulgaristan, Fransa, Almanya, İrlanda ve Çin'in bazı bölgelerinde yer alırken (Shamberger 1983), Se açısından fakir alanlar ise ABD'nin kuzey doğu ve güney doğusu, Kanada'nın doğu ve kuzeyi, Finlandiya'nın doğusu, Yeni Zelanda'nın kuzeyi, Çin'in kuzey doğu, güney batı bölgeleri ve Avustralya'nın bazı bölgelerinde yer almaktadır (Combs ve Combs 1984). Türkiye'de ise İç Anadolu ve Kuzey Anadolu bölgelerinde Se'dan fakir alanlar bulunmaktadır (Aydın 1997). Yetersizlik görülen bölgelerde, hayvanlara Se takviyesi önerilmektedir. Food and Drug Administration (FDA) 1987'de, ruminant beslenmesinde kuru madde başına 0,1 - 0,3 mg/kg Se eklenmesinin gerekli olduğunu bildirmiştir. Ancak Se'un toksik sınırı ile eksikliği arasında çok küçük bir sınır vardır; Avrupa Birliği'nde gerek inorganik gerekse de organik Se kaynakları, izin verilebilir maksimum düzey olan 0,568 mg/kg düzeyinde kullanılmaktadır (Phipps ve ark. 2008).

Selenyumun vücuda alımı başlıca yemle, daha az miktarlarda su ve hava ile gerçekleşir. Emilimi etkileyen faktörler arasında bitkinin türü, topraktaki Se'un kimyasal formu, rasyonun Vitamin E (Vit E), kükürt, yağ, protein, aminoasit ve kalsiyum içeriği sayılabilir (Davis ve ark. 1996). Bakır (Cu), (Kies ve Harms 1989), çinko (Zn) (Maret 2000) ve kadmiyum (Cd) (Kirchgesner ve ark., 1982) un da Se ile etkileşimi bulunmaktadır.

Selenyum, lipid peroksidasyonunu önleyen glutatyon peroksidazın (GPx) yapısına katılarak lipid peroksidasyonun önlenmesinde, ayrıca Vit E ile birlikte lökositleri ve makrofajları oksidatif serbest radikallerden koruyarak da immun sistemde önemli görevler üstlenmektedir (Witchtel ve ark. 1996). Koyunlarda eritrosit Se'unun %80'i GPx yapısındadır (Combs ve Combs 1984). Selenyum yetersizliğinde; Beyaz Kas Hastalığı (BKH), ateroskleroz ve koroner kalp hastalıkları meydana gelmektedir. Bu hastalıkların sebebi; Se eksikliğinden dolayı lipid peroksidasyonu ve prostaglandin metabolizmasının bozulmasıyla civa (Hg), Cd ve gümüş (Ag) gibi ağır metallerin kalp

üzerinde toksik etkilerinin artmasından kaynaklanmaktadır (Gerloff 1992; Ateşşahin 1999).

Selenyum meme hücrelerinin membranlarından kolaylıkla süte geçmektedir. Süt Se düzeyleri, yemle alınan Se düzeyiyle yakın ilişkilidir; rasyondaki Se değişikliğinden bir hafta sonra etkilenmeye başlar. Yeni doğanlar Se'u sütle anneden aldığı için annenin laktasyon dönemindeki Se alımı büyük önem kazanmaktadır (Abd El-Ghany ve ark. 2008).

Sunulan çalışmada, yavru ve verim kayıplarına sebep olabilen Se eksikliğini araştırılmasına yönelik olarak Ankara Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı ilçelerinde mera yetiştiriciliği yapan koyun yetiştiricilerinden elde edilen 20'şer adet Merinos melezi koyun ve bunların yavruları (10'ar adet), ayrıca karşılaştırma amacıyla Ankara Polatlı ilçesine bağlı TİGEM tarım işletmesinde bulunan Merinos melezi 20 adet koyun ve bunların yavruları (10'ar adet) kullanıldı. Bu kapsamda, koyunlardan laktasyon süresince toplam üç kez (1. 15. ve 45. günlerde) süt ve kan örnekleri, yavrularından ise belirtilen dönemlerde kan örnekleri alındı. Aynı dönemlerde hayvanların tükettiği yem ve suyun yanı sıra otlatılan meralardan toprak örnekleri de alındı. Alınan toprak, yem ve su örneklerinde Se, Cu, Zn, Cd, süt örneklerinde Se, serum örneklerinde ise Se, Cu, Zn, Cd ve Vit E düzeyleri ile aspartat amino transferaz (AST), kreatin kinaz (CK), laktat dehidrogenaz (LDH) ve GPx aktiviteleri belirlendi.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Ankara Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı ilçelerinde yarı açık barınaklarda, mera yetiştiriciliği yapan koyun yetiştiricilerinden elde edilen 20'şer adet Merinos melezi koyun ve bunların yavruları (10'ar adet), ayrıca karşılaştırma amacıyla Polatlı TİGEM tarım işletmesinde bulunan Merinos melezi 20 adet koyun ve bunların yavruları (10 adet) çalışmada kullanıldı. Tüm prosedürler ve hayvan uygulamaları Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yerel Etik Kurulu'nun 21.01.2013 tarih ve 2013/04 sayılı etik kurul izni ile yapıldı.

Koyunlar TİGEM tarım işletmesinde, yarı açık barınaklarda beslendiler. Her gün meraya çıkarılan hayvanlar, mera dönüşü, ihtiyaçları ölçüsünde saman ve koyun süt yemi (CP 5651) ile

beslendiler. Kuzular 15. günden itibaren kuzu başlangıç yemi (CP 5611) ile yeme alıştırmış ve 45. günden itibaren sütten tamamen kesilmişlerdir. Genel olarak en az bir ya da daha fazla doğum yapmış hayvanlar çalışmaya dahil edilmiş olup, bir batında ikiden fazla yavrulayan koyunlar çalışmaya dahil edilmedi. Rutin prosedürlere uygun olarak koyunlara doğuma 1 ay kala ticari Se/Vit E preparatı (1 ml'de 1 mg Sodyum selenit, 60 mg Vit E, 40 mg Vit B1 içeren),

Kuzularına da doğum sonrası 15-25. günler arasında ticari Se/Vit E preparatı (1 ml'de 1 mg Sodyum selenit, 60 mg Vit E, 40 mg Vit B1 içeren) ve ticari vitamin preparatı (1 ml'de; Vit A 500.000 IU, Vit D 75.000 IU, Vit E 50 mg içeren) uygulanmıştır.

### Yöntem

Koyunlardan laktasyon süresince toplam üç kez (1., 15. ve 45. günlerde) süt ve kan örnekleri, yavrularından ise belirtilen dönemlerde kan örnekleri alınmış olup, aynı dönemlerde hayvanların tükettiği yem ve suyun yanı sıra otlatılan meralardan toprak örnekleri alındı. Laktasyonda olan koyunların sütleri belirtilen zamanlarda 50 ml'lik steril polietilen tüplere alındı ve analize kadar -20 °C'de saklandı.

Serum parametrelerinin ölçümü için; kan örnekleri 3500 devirde 15 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve biyokimyasal parametreler ile iz element analizleri yapılmaya kadar -20 °C'de muhafaza edildi. Vit E analizi için ayrılan serumlar ışık hassasiyeti nedeni ile amber renkli eppendorf tüplerde analizleninceye kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Serumlarda (AST), kreatin kinaz (CK) ve laktat dehidrogenaz (LDH), aktiviteleri otoanalizör Biotechnica 3000 plus (Biotechnica Instruments S.p.A, Italy) ile gerçekleştirildi ve ölçümler ticari kitlerde (Quimica Clinica Aplicada) belirtilen uygun metodlara göre yapıldı.

Serumda Vit E analizi için, TOKER (2007)'in, modifiye HPLC metodu kullanıldı. Agilent XDB-C8 eclips 5µm-150x4.6 mm kolon kullanılan metotta, Akış hızı: 0,6 ml/dk, Kolon ısı: 25 °C, Enjeksiyon hacmi: 50 µl, MeOH/ACN karışım oranı: 75-25, Dalga boyu: 325 nm olarak belirlendi. Okumalar Agilent 1100 HPLC cihazında DAD dedektör ile yapıldı.

GPx aktivitesinin belirlenmesi amacıyla, eşzamanlı olarak kanlar antikoagulanlı tüplere (EDTA) alındı, eritrositlerin ayırılması için, hemen +4 °C'de 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Eritrosit pelleti elde edilerek soğuk distile su

ile ¼ oranında hemolizat elde edildi ve hemolizat - 80 °C'de derin dondurucuda analiz yapılmaya kadar saklandı. Eritrosit GPx aktivitesi, spektrofotometrik olarak ticari kit ile belirlendi (Oxis GPx-340 Kit, Oxis Research, Foster City, CA).

### Serum, yem, su ve toprak iz elementlerinin analizi

*Serum, süt ve su örneklerinin hazırlanması*; 1 ml serum ve 2 ml süt örnekleri alınarak üzerlerine analitik saflıkta 5 ml HNO<sub>3</sub> (%65) ve 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (%30) ilave edildi. Serum ekstraksiyon işlemi sadece bu amaca yönelik Berghof MWS marka mikrodalgaya ait serum ve kan ekstraksiyon tüplerinde, metoduna uygun ısı, güç ve zaman programlaması kullanılarak gerçekleştirildi (Anon 2004). Su örneğinden 3 ml teflon kaba alındı, üzerine su ekstraksiyonu için hazırlanan çözeltiden [Potasyum peroksit sülfatan (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) 12,5 g, Sodyum hidroksit (NaOH, 1 mol/L) 5 ml alınıp 250 ml sulandırıldı] 3 ml alınarak teflon kapların kapağı kapatıldı. Örnekler metoduna göre mikrodalga fırında yakma işlemi ile ayrıştırıldı (AOAC metot 999.10).

*Yem ve toprak örneklerinin hazırlanması*; taneli yemlerden 0,3 g, yonca, ot, saman ve toprak parçasından 0,2'şer g örnek alınarak teflon kaplara alındı, üzerine 5 ml HNO<sub>3</sub> (%65) eklenerek kapakları kapatıldı ve her bir örnek metoduna göre mikrodalga fırında yakma işlemi ile ayrıştırıldı (AOAC metot 999.10).

Mikrodalga yakma yöntemi sonrasında serum, yem, su ve toprak numunelerinde Se, Cu, Zn, Cd analizleri için ICP-MS (İndüktif Eşleştirilmiş Plazma Kütle Spektrometresi) cihazında N.M.L.K. 186 referans metodu kullanıldı.

### İstatistiksel Analiz

Elde edilen değerler SPSS 15.0 programında ANOVA ile değerlendirilerek, gruplararası farklılıklar Duncan testi ile ortaya konuldu. Korelasyon analizleri için Pearson Korelasyon uygulandı ve p<0.05 önem düzeyi, önemli kabul edildi.

## BULGULAR

Merinos melezi koyunlarda serum biyokimyasal parametreleri Tablo 1' de sunuldu.

**Tablo 1.** Merinos melezi koyunlarda serum biyokimyasal parametreleri (Ort±SH, n=20)

AST (U/L)	1.Gün	15.Gün	45.Gün	p
<b>Kontrol</b>	88,06±4,20 a C	89,15±5,77 a B	109,11±8,88 b A	<0,05
<b>Polatlı</b>	143,88±16,22 B	122,36±8,24 B	114,76±7,06 A	-
<b>Bey pazarı</b>	143,55±11,05 B	196,61±28,92 A	170,70±19,73 B	-
<b>Gölbaşı</b>	194,77±14,97 A	229,07±20,21 A	195,63±20,24 B	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	
CK (U/L)				
<b>Kontrol</b>	75,82±6,37 B	72,60±4,72 B	70,90±4,08 C	-
<b>Polatlı</b>	82,24±10,78 B	78,13±2,88 B	79,11±4,95 BC	-
<b>Bey pazarı</b>	80,33±1,73 B	83,37±7,80 B	94,20±8,20 AB	-
<b>Gölbaşı</b>	117,13±11,94 A	133,45±8,27 A	111,60±8,02 A	-
<b>p</b>	<0,001	<0,01	<0,001	-
LDH (U/L)				
<b>Kontrol</b>	327,00±21,72	323,43±24,60 AB	325,11±15,08	-
<b>Polatlı</b>	313,96±33,25	327,19±13,34 A B	346,58±20,71	-
<b>Bey pazarı</b>	309,45±23,25	270,60±20,20 B	277,90±29,68	-
<b>Gölbaşı</b>	297,64±23,44	334,20±17,54 A	333,85±24,67	-
<b>p</b>	-	<0,05	-	-
VIT E (µg/ml)				
<b>Kontrol</b>	4,33±0,34 A	4,94±0,31 A	4,97±0,43 A	-
<b>Polatlı</b>	3,13±0,27 B	2,67±0,21 B	2,53±0,16 B	-
<b>Bey pazarı</b>	2,67±0,28 BC	2,28±0,36 BC	2,04±0,11 B	-
<b>Gölbaşı</b>	2,07±0,14 a C	1,72±0,09 b C	2,17±0,11 a B	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	
GPx(U/g)				
<b>Kontrol</b>	69,81±4,20 A	74,22±3,72 A	67,94±2,77 A	-
<b>Polatlı</b>	55,74±6,15 B	57,02±7,79 B	56,03±3,46 B	-
<b>Bey pazarı</b>	62,70±3,39 ab AB	56,71±3,94 b B	68,23±3,88 a A	<0,05
<b>Gölbaşı</b>	66,71±3,54 AB	58,64±4,14 B	64,70±3,88 AB	-
<b>p</b>	<0,05	<0,05	<0,05	

Koyun serum AST düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu 45. gün düzeyleri, 1. ve 15. gün düzeylerine göre yüksek ( $p<0,05$ ) iken, diğer bölgelerde önemli bir fark gözlenmedi. Diğer yandan 1. 15. ve 45. günlerde, Gölbaşı AST düzeylerinin, diğer bölgelere göre en yüksek düzeylerde ( $p<0,001$ ) olduğu belirlendi. En düşük ( $p<0,001$ ) AST düzeyleri ise Kontrol grubunda belirlendi.

CK düzeyleri de AST düzeyleri ile paralel olarak en yüksek ( $p<0,001$ ) Gölbaşı grubunda en düşük düzeyler ise Kontrol grubunda belirlendi ( $p<0,001$ ). Günler arasında ise önemli bir farklılık belirlenmedi.

LDH düzeyleri incelendiğinde, yalnızca 15. günde Gölbaşı düzeylerinin yüksek olması ( $p<0,05$ ) dışında önemli bir fark belirlenmedi.

Vit E düzeyleri 1. ve 45. günlerde Polatlı, Bey pazarı ve Gölbaşı gruplarında Kontrol grubuna göre düşük olarak belirlendi ( $p<0,001$ ).

GPx düzeyleri incelendiğinde, Bey pazarı grubu 45. gün düzeyleri, 15. gün düzeylerinden yüksek idi ( $p<0,05$ ). Gruplar arası fark incelendiğinde, 1. günde Polatlı grubu GPx düzeyleri, Kontrol grubuna göre düşük ( $p<0,05$ ), 15. günde, Kontrol grubu düzeyleri diğer 3 gruba göre yüksek ( $p<0,05$ ), 45. günde ise Polatlı grubu, Kontrol ve Bey pazarı grubundan düşük ( $p<0,05$ ), Gölbaşı grubu ile aynı olarak belirlendi ( $p>0,05$ ).

Merinos melezi kuzularda serum biyokimyasal parametreleri Tablo 2'de verildi.

**Tablo 2.** Merinos melezi kuzularda serum biyokimyasal parametreleri (Ort±SH, n=10)

AST (U/L)	1.Gün	15.Gün	45.Gün	p
<b>Kontrol</b>	112,16±14,66 ab C	95,90±11,60 b C	153,25±20,21 a B	<0,05
<b>Polatlı</b>	97,95±8,63 C	91,38±7,28 C	110,20±11,07 B	-
<b>Bey pazarı</b>	183,88±18,23 B	188,86±20,03 B	185,50±31,23 B	-
<b>Gölbaşı</b>	274,75±22,15 A	259,00±26,45 A	271,17±29,62 A	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	
CK (U/L)				
<b>Kontrol</b>	74,77±8,59 B	62,09±5,35 B	75,27±5,79 B	-
<b>Polatlı</b>	88,585±8,37 a B	65,635±5,40 b B	79,32±5,26 B	<0,05
<b>Bey pazarı</b>	91,79±15,64 B	95,90±16,77 B	89,65±17,02 B	-

\*Aynı satırdaki küçük harfler ile aynı sütündeki büyük harfler istatistiki açıdan önemlidir.

<b>Gölbaşı</b>	154,73±13,76 A	149,88±21,97 A	136,13±15,29 A	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,01	
<b>LDH (U/L)</b>				
<b>Kontrol</b>	118,59±35,22 a B	273,20±32,35 b	363,33±56,83	<0,01
<b>Polatlı</b>	345,66±20,05 A	309,36±22,41	316,79±20,94	-
<b>Beypazarı</b>	305,86±17,06 A	338,75±45,02	283,68±45,12	-
<b>Gölbaşı</b>	328,30±35,54 A	365,13±23,48	401,64±22,61	-
<b>p</b>				
<b>VITE (µg/ml)</b>				
<b>Kontrol</b>	2,91±0,41 a A	3,38±0,32 ab A	3,93±0,22 b A	<0,05
<b>Polatlı</b>	2,24±0,15 B	1,94±0,09 B	2,09±0,09 B	-
<b>Beypazarı</b>	1,90±0,08 B	1,97±0,07 B	1,78±0,08 BC	-
<b>Gölbaşı</b>	1,69±0,10 B	1,79±0,10 B	1,47±0,14 C	-
<b>p</b>	<0,01	<0,001	<0,001	
<b>GPx(U/g)</b>				
<b>Kontrol</b>	61,53±4,05 A	57,71±7,98	52,82±6,30 B	-
<b>Polatlı</b>	44,41±4,98 C	55,06±4,07	49,96±4,15 B	-
<b>Beypazarı</b>	56,68±1,74 AB	60,09±2,85	68,08±5,78 A	-
<b>Gölbaşı</b>	47,86±2,46 BC	51,97±2,71	50,61±2,32 B	-
<b>p</b>	<0,01		<0,05	

Not: Aynı satırdaki küçük harfler ile aynı sütundaki büyük harfler istatistiki açıdan önemlidir.

Kuzularda AST düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu 45. gün düzeyleri, 15. gün düzeylerine göre yüksek ( $p<0,05$ ), 1. gün düzeyleri ile aynı olarak belirlendi. Diğer bölgelerde önemli bir fark gözlenmedi. 1. 15. ve 45. günlerde, Gölbaşı AST düzeyleri diğer 3 bölgeden yüksek olarak belirlendi ( $p<0,001$ ).

CK düzeyleri 1. 15. ve 45. günlerde en yüksek Gölbaşı, en düşük Kontrol grubunda belirlendi ( $p<0,001$ ). Günler arasında ise Polatlı grubu dışında önemli bir fark belirlenmedi.

LDH düzeyleri incelendiğinde, 1. gün Kontrol grubu düzeyleri 15. ve 45. gün düzeylerine göre düşük ( $p<0,01$ ), yine 1. gün Kontrol grubu düzeyleri diğer 3 bölge grubuna göre düşük idi ( $p<0,001$ ).

Vit E düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu 45. gün düzeyleri

1. gün düzeylerinden yüksek iken ( $p<0,05$ ), diğer gruplarda günler arasında önemli bir fark belirlenmedi. Gruplar arasında 1. 15. ve 45. günlerde, Vit E düzeyleri, 3 bölgede de, Kontrol grubuna göre düşük ( $p<0,001$ ). olarak belirlendi.

GPx düzeyleri incelendiğinde günler arasında önemli bir fark gözlenmedi. 1. günde Polatlı ve Gölbaşı GPx düzeyleri, Kontrol grubuna göre düşük olarak ( $p<0,01$ ) belirlendi. 45. gün düzeylerinde en yüksek düzeyler Beypazarı grubunda görüldü ( $p<0,05$ ).

**Tablo 3.** Merinos melezi koyunlarda serum iz element düzeyleri (Ort±SH)(Ort±SH, n=20)

<b>Selenyum (µg/L)</b>	<b>1.Gün</b>	<b>15.Gün</b>	<b>45.Gün</b>	<b>p</b>
<b>Kontrol</b>	89,70±4,91 A	89,58±4,00 A	84,03±3,13 A	-
<b>Polatlı</b>	49,95±4,66 B	41,73±3,54 B	40,16±3,09 B	-
<b>Beypazarı</b>	61,92±5,33 B	53,00±4,85 B	49,67±4,42 B	-
<b>Gölbaşı</b>	34,79±4,28 C	28,14±3,42 C	39,20±4,21 B	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	
<b>Bakır (µg/dl)</b>				
<b>Kontrol</b>	116,49±4,90 a A	102,29±4,02 b A	93,31±3,97 b A	<0,01
<b>Polatlı</b>	59,65±6,25 B	64,92±4,55 B	67,64±4,58 B	-
<b>Beypazarı</b>	90,61±8,30 C	85,23±7,00 C	89,27±8,34 A	-
<b>Gölbaşı</b>	67,02±3,63 B	66,29±3,64 B	65,37±4,37 B	-
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	
<b>Çinko (µg/dl)</b>				
<b>Kontrol</b>	139,04±8,84 a A	123,02±7,5 ab A	105,46±6,20 b b	
<b>Polatlı</b>	133,81±14,79 a A	117,02±12,6 ab A	94,52±7,38 b b	
<b>Beypazarı</b>	161,61±11,87 a A	124,66±9,51b A	106,25±8,32 b b	
<b>Gölbaşı</b>	85,26±5,74 B	82,27±5,76 B	99,19±7,73 b	-
<b>p</b>	<0,001	<0,01	-	
<b>Kadmiyum(µg/L)</b>				
<b>Kontrol</b>	0,033±0,008	0,032±0,008	0,034±0,008	-
<b>Polatlı</b>	0,016±0,005	0,030±0,007	0,020±0,008	-
<b>Beypazarı</b>	0,022±0,007	0,030±0,008	0,022±0,008	-
<b>Gölbaşı</b>	0,016±0,005	0,031±0,008	0,021±0,008	-
<b>p</b>	-	-	-	

Not: Aynı satırdaki küçük harfler ile aynı sütundaki büyük harfler istatistiki açıdan önemlidir.

Koyunlarda serum Se düzeyleri incelendiğinde günler arasında önemli bir fark gözlenmedi. Gruplar arasında 1. ve 15. gün Se düzeyleri en yüksek Kontrol grubunda iken ( $p<0,001$ ), en düşük Se düzeyleri Gölbaşı grubunda tespit edildi ( $p<0,001$ ). 45. günde ise en yüksek Se düzeyleri Kontrol grubunda belirlendi ( $p<0,001$ ).

Cu değerleri incelendiğinde Kontrol grubunda 1. gün düzeyleri 15. ve 45. gün düzeylerinden yüksek iken ( $p<0,01$ ), diğer gruplarda günler arasında önemli bir fark tespit edilmedi. Gruplar arasında, 1. ve 15. günlerde en yüksek Cu düzeyleri Kontrol grubunda belirlendi ( $p<0,001$ ).

Kontrol grubu 1. gün Zn düzeyleri, 45. gün Zn düzeylerinden yüksek ( $<0,05$ ), Polatlı grubunda yine benzer şekilde 1. gün Zn düzeyleri, 45. gün Zn düzeylerinden yüksek ( $p<0,05$ ), Beypazarı grubunda da 1. gün Zn düzeyleri 15. ve 45. gün Zn düzeylerinden yüksek olarak belirlendi ( $p<0,001$ ). Gölbaşı grubunda günler arasında önemli bir fark belirlenmedi. Gruplar arasında; Gölbaşı grubu 1. gün ( $p<0,001$ ) ve 15. gün düzeyleri ( $p<0,01$ ), diğer 3 bölge grubuna göre en düşük olarak belirlendi.

Cd düzeylerinde gruplar ve günler arasında önemli bir fark belirlenmedi.

Merinos melezi kuzularda serum iz element düzeyleri Tablo 4' de sunulmuştur.

**Tablo 4.** Merinos melezi kuzularda serum iz element düzeyleri (Ort±SH, n=10)

Selenyum (µg/L)	1.Gün	15.Gün	45.Gün	p
Kontrol	90,43±10,70 A	86,15±8,34 A	71,00±5,82 A	-
Polatlı	55,46±6,25 B	55,34±4,79 B	48,06±4,46 B	-
Beypazarı	81,90±13,42 A	76,45±4,82 A	70,72±4,29 A	-
Gölbaşı	52,71±4,99 B	47,00±4,46 B	41,65±4,10 B	-
p	<0,01	<0,001	<0,001	
Bakır (µg/dl)				
Kontrol	113,10±12,27 a AB	99,63±11,04 ab A	79,95±7,99 b	<0,05
Polatlı	76,01±5,83 C	56,78±5,83 C	73,89±8,25	-
Beypazarı	140,44±12,19 a A	97,89±8,28 b AB	72,90±6,65 b	<0,001
Gölbaşı	87,67±6,87 a BC	75,91±5,96 ab BC	67,43±5,63 b	<0,05

p	<0,001			
Çinko (µg/dl)				
Kontrol	89,09±7,60 B	94,74±7,44	86,90±6,10	-
Polatlı	159,14±18,56 a A	107,34±14,07 b	84,72±7,78 b	<0,01
Beypazarı	159,14±18,56 a A	112,39±12,87	100,68±12,46	-
Gölbaşı	131,25±14,55 a A	106,21±10,92 ab	80,39±6,77 b	<0,05
p	<0,01	-	-	
Kadmiyum(µg/L)				
Kontrol	0,004±0,002	0,005±0,002	0,008±0,003	-
Polatlı	0,011±0,003	0,008±0,003	0,006±0,003	-
Beypazarı	0,010±0,003	0,008±0,002	0,004±0,002	-
Gölbaşı	0,007±0,002	0,008±0,003	0,012±0,003	-
p	-	-	-	

Not: Aynı satırdaki küçük harfler ile aynı sütundaki büyük harfler istatistiki açıdan önemlidir.

Kuzularda serum Se düzeyleri incelendiğinde gruplar ve günler arasında önemli bir fark tespit edilmedi. Gruplar arası farklılık incelendiğinde, 1. 15. ve 45. günlerde, Polatlı ve Gölbaşı grupları serum Se düzeyleri, Kontrol ve Beypazarı gruplarından düşük ( $p<0,01$ ) olarak belirlendi.

Kontrol grubu 1. günde Cu düzeyleri, 45. gün düzeylerine göre yüksek olarak belirlendi ( $p<0,05$ ). Beypazarı grubu 1. gün Cu düzeyleri 15. ve 45. gün düzeylerinden yüksek olarak tespit edildi ( $p<0,001$ ). Gölbaşı grubu 1. gün Cu düzeyleri, 45. gün düzeylerine göre daha yüksek olarak belirlendi ( $p<0,05$ ). 1. Gün Polatlı ve Gölbaşı grupları serum Cu düzeyleri, Kontrol ve Beypazarı gruplarına göre daha düşük olarak tespit edildi (0,001).

Zn düzeyleri incelendiğinde, Polatlı grubu 1. gün Zn düzeyleri, 15. ve 45. gün düzeylerinden yüksek ( $p<0,01$ ), Gölbaşı grubu 1. gün düzeyleri, 45. gün düzeylerinden yüksek olarak tespit edildi ( $p<0,05$ ).

Kuzularda serum Cd düzeylerinde gruplar ve günler arasında önemli bir fark görülmedi.

Merinos melezi koyunlarda süt Se düzeyleri Tablo 5'de sunuldu.

**Tablo 5.** Merinos melezi koyunlarda süt selenyum düzeyleri (Ort±SH, n=20)

Selenyum (µg/L)	1.Gün	15.Gün	45.Gün	p
<b>Kontrol</b>	33,70±1,09 a A	25,62±1,45 b A	19,33±0,82 c A	<0,001
<b>Polatlı</b>	28,82±1,34 a B	21,21±0,79 b B	16,08±16,08 c B	<0,001
<b>Bey pazarı</b>	26,83±1,15 a B	20,01±0,64 b B	15,01±0,82 c B	<0,001
<b>Gölbaşı</b>	23,35±1,19 a C	16,28±1,23 b C	15,42±0,47 b B	<0,001
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001	

Not: Aynı satırdaki küçük harfler ile aynı sütündeki büyük harfler istatistikî açıdan önemlidir.

Kontrol, Polatlı ve Bey pazarı gruplarında, en yüksek süt Se düzeyleri 1. günde, en düşük süt Se düzeyleri ise 45. günde belirlendi ( $p<0,001$ ). Gölbaşı grubunda ise 1. gün Se düzeyleri, 15. ve 45. gün Se düzeylerinden yüksek olarak belirlendi ( $p<0,001$ ). Gruplar arasında Se düzeyleri incelendiğinde 1.ve 15. günlerde, en yüksek düzeyler Kontrol grubunda, en düşük düzeyler ise Gölbaşı grubunda belirlendi ( $p<0,001$ ). 45. gün Se düzeyleri incelendiğinde, Kontrol grubu düzeyleri diğer 3 bölge grubuna göre yüksek olarak belirlendi ( $p<0,001$ ).

Toprak, su ve yem iz element düzeyleri (mg/kg) Tablo 6'da sunuldu.

**Tablo 6.** Yem, su ve toprak iz element düzeyleri (mg/kg)

	Cu	Zn	Se	Cd
<b>Kontrol</b>				
<b>Karma</b>	11,73	224,11	0,33	0,060
<b>Pelet</b>	15,64	103,63	0,42	0,061
<b>Ot</b>	6,32	20,53	0,06	0,014
<b>Yonca yaprak</b>	7,93	32,89	0,06	0,016
<b>Su (ppb)</b>	0,002	288,1	0,48	0,001
<b>Toprak</b>	3,15	2,42	0,8	0,0001
<b>Polatlı</b>				
<b>Arpa</b>	3,76	22,12	0,05	0,003
<b>Pelet</b>	13,27	66,14	0,33	0,020
<b>Saman</b>	1,55	17,40	0,01	0,009
<b>Ot</b>	5,32	16,65	0,04	0,008
<b>Su (ppb)</b>	0,0036	295,2	0,35	0,001
<b>Toprak</b>	1,91	2,62	0,60	0,001

Bey pazarı				
<b>Karma</b>	12,89	22,86	0,21	0,060
<b>Yonca sap</b>	6,98	22,39	0,03	0,008
<b>Saman</b>	1,78	21,23	0,01	0,009
<b>Yonca yaprak</b>	8,36	35,26	0,05	0,012
<b>Su (ppb)</b>	0,012	299,0	0,31	0,001
<b>Toprak</b>	1,02	3,12	0,95	0,001
<b>Gölbaşı</b>				
<b>Karma</b>	10,23	45,23	0,23	0,001
<b>Saman</b>	1,85	20,36	0,01	0,010
<b>Ot</b>	6,35	18,23	0,05	0,010
<b>Yonca sap</b>	7,31	21,72	0,03	0,008
<b>Arpa</b>	4,23	18,23	0,09	0,003
<b>Su (ppb)</b>	0,00	268,5	0,34	0,001
<b>Toprak</b>	2,02	2,15	0,65	0,001

## TARTIŞMA

Sunulan çalışma ile yarı açık barınaklarda, mera yetiştiriciliği yapılan çiftliklerden elde edilen Merinos melezi koyunlarda ve bunların yavrularında laktasyonun 1. 15. ve 45. günlerinde Se ve BHK ile ilişkili bazı biyokimyasal parametreler analiz edildi ve bunlardan bazılarının değiştiği gözlemlendi.

Hayvanların Se ihtiyacı, Se'un kimyasal formuna, Vit E, lipitler, proteinler, amino asitler, kükürt (S), Cu, Hg, arsenik (As) gibi Se metabolizmasında görev alan veya rasyonda Se ihtiyacını artıran faktörlere göre değişmektedir (Davis ve ark. 1996). Selenyum, eksikliğinde, oğlaklarda, buzağılarda ve kuzularda muskuler distrofiye neden olan ve reproduktif açıdan önemli olan bir iz elementtir. Beyaz kas hastalığı, dünyanın farklı yerlerinde eko-nomik kayıplara neden olan, kalp ve iskelet kaslarında hyalin dejenerasyonu ile karakterize nutrisyonel bir hastalıktır. Selenyum, Vit E ile birlikte BHK'nın önlenmesinde rol almaktadır (Robson 2007).

Merinos ırkı koyunlarda serum Se düzeyleri 51-55 µg/L (Judson ve ark. 2011), Akkaraman koyunlarda ise 96 - 107 µg/L (Gürdoğan ve ark. 2004) bildirilmiştir. Koyunlarda, Kontrol grubu serum Se düzeyleri literatürde bildirilen aralıkta iken, Polatlı ve Gölbaşı gruplarında referans düzeylerin altında, Bey pazarı'nda da referans alt düzeylere yakın olarak tespit edildi. Yavrularda ise Polatlı ve Gölbaşı grubunda referans alt düzeylere yakın iken, Bey pazarı grubunda referans düzeylerde tespit edildi. Koyunlarda, her 3 örnekleme zamanında da (1.

15. ve 45. günlerde) serum Se düzeyleri Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarında, Kontrol grubuna göre önemli düzeyde ( $p<0,001$ ) düşük iken, en düşük olduğu grup Gölbaşı grubu idi. Yavrularda da Gölbaşı grubu serum Se düzeyleri Kontrol'e göre önemli düzeyde ( $p<0,01$ ) düşük olarak belirlendi. Tüm gruplarda, koyunlarda ve kuzularda, serum Se düzeyleri laktasyonun ilerleyen zamanlarında (1. 15. ve 45. günlerde) önemli bir değişime uğramazken, koyun Kontrol grubunda serum Se düzeylerinin Merinos koyunlarda literatürde bildirilen düzeylerde olmasının, rutin bir uygulama olarak, bu hayvanlara doğumdan önce Se takviyesi yapılmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Diğer bölgelerde ise, koyun serum Se düzeylerinin referans düzeylerin ve Kontrol grubunun altında seyretmesi, bu hayvanlara Se takviyesinin yetersiz/yapılmamış olduğunu düşündürmektedir.

Süt Se düzeyleri incelendiğinde de Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarındaki Se düzeyleri, Kontrol grubundan önemli düzeyde düşük ( $p<0,001$ ) iken en düşük düzeyler Gölbaşı grubunda belirlendi. Gölbaşı bölgesindeki koyunlardaki süt ve serum Se düzeylerinin diğer bölgelere göre oldukça düşük olması, bu bölgenin Se yönünden kritik bir bölge olduğunu göstermektedir.

Sunulan çalışmada toprak Se düzeyleri (0,8 ppm) Se yetersizliği için bildirilen kritik düzeylerin ( $<0,5$  ppm, Watkinson 1983) biraz üzerinde hesaplanırken, yem Se düzeylerinin 0,06 (yonca, ot)-0,42 (pelet) ppm aralıklarında olduğu belirlendi. Food and Drug Administration (FDA) 1987'de, ruminant beslenmesinde kuru madde başına 0,1 - 0,3 ppm Se eklenmesinin gerekli olduğunu bildirmiştir. Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı'ndaki koyunlarda, mera ağırlıklı besleme nedeniyle, Se eksikliğinin görüldüğü düşünülmektedir.

Laktasyon boyunca süt Se düzeylerinin düştüğü bildirilmiştir. Bektaş ve Altıntaş (2011), Merinos (laktasyonun 15. 45. ve 75. günlerinde) ve Akkaraman melezi (laktasyonun 15. 75. ve 150. günlerinde) koyunlarda süt Se düzeylerinin giderek azaldığını rapor etmişlerdir. İnsan sütünde de laktasyonun ilerlemesi ile süt Se düzeylerinde azalma olduğu bildirilmiştir (Perrone ve ark 1993). Sunulan çalışmada her 4 grupta da laktasyonun ilerlemesi ile süt Se düzeyleri önemli düzeylerde düşüş ( $p<0,001$ ) gösterdi. Kuzulardaki serum Se düzeylerinin laktasyonun ilerlemesi ile değişmemesi, yavrunun zamanla

başka kaynaklardan (yem, yavrulara Se desteği...) Se ihtiyacını karşılaması sebebiyle anne sütü Se düzeylerine ihtiyacının azalması ile açıklanabilir. Zira sütteki komponentler, yavrunun ihtiyacına göre belirlenmektedir; yapılan diğer bir çalışmada da insan sütünde bazı iz element düzeylerinin, laktasyonun ilerlemesi ile düştüğü ortaya konulmuştur (Rossipal ve Krachler 1998).

Koyunlarda serum Vit E düzeyleri, 1,4-2,4 µg/ml (Judson ve ark. 2011) aralığında bildirilmiştir. Sunulan çalışmada, koyunlarda ve yavrularında, serum Se düzeyleri literatürde bildirilen düzeyler ile uyumlu idi. Ancak, serum Se düzeylerine paralel olarak, Vit E düzeyleri de, hem koyunlarda ( $p<0,001$ ) hem de kuzularında ( $p<0,01$ ), (koyunlarda en düşük Gölbaşında olmak üzere) Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarında Kontrol gruba göre önemli düzeyde düşük olarak belirlendi. Vit E, Se ile birlikte, serbest radikallere karşı organizmanın korunmasında ve BKH'ndan korunmada önemlidir (Milad ve Kovac 1998). Doğum öncesinde koyunlara ve doğum sonrasında kuzulara Se uygulanması, BKH'ı önlerken aynı zamanda kuzuların büyüme oranını artırmıştır. Kuzulara doğumda yüksek dozlarda Vit E enjeksiyonu da BKH'dan korunmaya fayda sağlarken kuzuların büyüme oranında bir değişime neden olmamıştır. Bu nedenlerle Se ve Vit E'nin birlikte uygulanmasının hem BKH'dan korunmada hem de yavruların hızlı büyümesinde faydasının olacağı ortadadır. İncelenen 3 bölgedeki Se ve Vit e düzeylerinin Kontrol grubuna göre düşük olması, bu bölgelerdeki koyunlara doğum öncesinde takviye yapılmasının gerekli olduğunu göstermektedir.

Koyunlarda eritrosit Se'unun %80'i GPx yapısındadır. Hoshino ve ark. (1989) serum Se düzeylerini düşük tespit ettikleri BKH olan buzağılarda, kan GPx aktivitesinin de düşük olduğunu belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlarda ise GPx düzeyleri ile Se düzeyleri arasında, Gölbaşı grubunda, yavrularda 1. günde, koyunlarda da 15. günde düşük GPx düzeyleri dışında, belirgin bir bağıntı gözlenmedi. Serum Se düzeyinin diyetle alınan Se'dan kısa sürede (gün içinde bile) etkilendiği, eritrosit içindeki Se'un ise 3-4 aylık Se alımını yansıttığı bildirilmiştir (Stacchini ve ark. 1989; Bostedt ve Schramel 1990). Bu çalışmada elde edilen verilere göre, GPx aktivitesinin, düşük Se düzeylerinden etkilenmesi için gerekli sürenin 45. günde henüz tamamlanmamış olabileceği düşünülmektedir.

Kreatin kinaz tüm evcil hayvanlarda düz kas dokularında bulunur ve musküler hasarın önemli indikatörü olarak görülür (Bostedt ve Schremal 1990). Aspartat aminotransferaz, iskelet kası, miyokard ve karaciğerde yüksek konsantrasyonda, eritrositlerde ve böbreklerde daha az konsantrasyonda bulunmaktadır (Turgut 1995).

Kreatin kinaz ile birlikte AST enzim aktivitesinin artışı ve LDH5 ve LDH1 izoenzim seviye artışları BKH'nın göstergesi olarak klasik kaynaklarda yerini almıştır (Kaneko 1997). Subklinik BKH'lı kuzularda AST, CK ve LDH değerlerinin sırasıyla 32, 69 ve 6 kat arttığı bildirilmiştir (Voyvoda ve ark 1996). Sunulan çalışmada, koyunlarda Polatlı, Beypazarı ve Gölbaşı grubunun (en yüksek Gölbaşı'nda olmak üzere) AST ve CK düzeylerinin artışları, yavrularında da AST düzeylerinin Beypazarı ve Gölbaşı grubunda, AST ve CK düzeylerinin Gölbaşı grubunda Kontrol grubuna göre yüksek olması, bu hayvanların BKH'nın gelişimine açık olduğunu ve hafif bir myopatinin başladığını düşündürmektedir. Sığırlarda BKH rastlanılan bir çiftlikteki hayvanlardan kan alınarak yapılan bir çalışmada, hayvanların serum AST düzeylerinin kontrole göre 1.5 kat yükseldiği, CK düzeylerinin ise 7 katlık bir artış gösterdiği bildirilmiştir (Karapınar ve Yılmaz 2007). Aynı çalışmada Vit E düzeyleri 2.6 katlık bir düşüş göstermiştir. Sunulan çalışmada elde edilen Vit E düzeyleri incelendiğinde, Gölbaşı grubu kuzu serum Vit E düzeyleri 1. 15. ve 45. günlerde Kontrol gruba göre önemli düzeyde düşük olarak belirlendi. Bu düşüklüğün aynı grupta ortaya çıkan AST ve CK artışları ile ilişkilendirilebileceği değerlendirildi.

Çalışmada koyun ve kuzuların LDH düzeyleri, literatürde bildirilen üst sınırın üzerinde çıkmadı (Voyvoda ve ark. 1996). Bu durum akut kas dejenerasyonlarında LDH'nin daha geç süreçte tepki veren bir parametre olması dolayısı ile akut vakaların fazla olmadığı gruplarda ortalamayı etkileyecek yükselişlerin olmaması ile ilişkilendirildi.

Sunulan çalışmada, koyunlarda Kontrol grubu serum Cu düzeyleri Judson ve ark. (82,6 µg/dl) ve Jelinek ve ark. (109,7 µg/dl)'in Merinos ırkı koyunlarda bildirdiği düzeyler ile uyumlu olarak belirlendi. Polatlı ve Gölbaşı koyun serum Cu düzeyleri, hem Merinos koyunlarda bildirilen referans Cu düzeylerinden düşük, hem de koyunlarda Cu yetersizliği için bildirilen kritik Cu düzeylerine (Underwood, 1977) yakın (koyunlarda en düşük

59,65, kuzularda en düşük 56,78 µg/dl) olarak belirlendi. Ayrıca, laktasyonun ilerleyen zamanlarında, her 3 bölgeye ait koyunların serum Cu düzeyleri, Kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük p<0,001) idi. Laktasyonun ilerlemesi ile koyunlarda serum Cu düzeyleri sadece Kontrol grubunda, kuzularda ise Kontrol, Beypazarı ve Gölbaşı gruplarında düştü. Hayvanların tükettiği yem örneklerinde Cu düzeyleri 6,32 (mera otu) -15,64 (pelet) ppm aralıklarında belirlendi. Alp ve ark. (2001), Marmara bölgesindeki 55 ayrı yerden aldıkları yöresel yem bitki örneklerinde Cu değerini yoncada 2.78-7.59, buğdayda 5.20-7.70 ppm olarak tespit etmişlerdir. Elde edilen yem Cu düzeylerinin beslenme için yeterli düzeylerde olduğu düşünülmektedir. Sunulan çalışmada serum Cu düzeylerinin düşük olması durumunun, Cu'nun bir Se antagonisti olduğu (Jensen 1975) da dikkate alınarak, detaylı çalışmalarla incelenmesi önerilmektedir.

Koyunlarda elde edilen serum Zn düzeyleri tüm gruplarda, genel olarak, koyunlarda bildirilen düzeyler 77 (Özçelik ve ark. 2015)-204 µg/dl (Baydar ve ark. 2015) aralığında olduğu belirlendi. Niekerk ve Niekerk (1990), Merinos melezi (Dohne Merinos) koyunlarda tam kan Zn düzeylerini doğumdan sonra 2. günde 90 µg/dl, 2. haftada 97 µg/dl, 6. haftada ise 122 µg/dl olarak bildirilmişlerdir. Aynı koyunların kuzularında doğumdan sonra 2. günde 169 µg/dl, 2. haftada 111 µg/dl ve 6. haftada 99 µg/dl olarak belirlemişlerdir (istatistik önem belirtilmemiştir). Sunulan çalışmada, Niekerk ve Niekerk (1990)'ın bulgularıyla uyumlu olarak Polatlı ve Gölbaşı gruplarının kuzularında laktasyonun ilerlemesi ile önemli düşüşler belirlenirken, bu araştırmacıların bulgularından farklı olarak koyunlarda Gölbaşı grubu haricindeki diğer tüm gruplarda serum Zn düzeylerinde önemli düşüşler elde edildi. Ancak serum Zn düzeylerinde düşüş olsa dahi düzeylerin literatürde bildirilen referans aralıkta (Özçelik ve ark. 2015, Baydar ve ark. 2015) olduğu gözlemlenmiştir.

Sunulan çalışmada hayvanların tükettiği yem örneklerinde serum Zn düzeyleri, en yüksek (pelet) 103,63, en düşük (mera otu) 20,53 ppm olarak tespit edildi. Küçükkaya (2000) yoncada Zn düzeylerini 25,92, kuzu büyütme yeminde 113,52 ppm olarak bildirmiştir. Alp ve ark. (2001), arpa, buğday ve mısırdaki Zn düzeylerini sırasıyla 15,58, 16,10 ve 11,20 ppm, çayır-mera otunda ve yoncada sırasıyla 22,74 ve 16,33 ppm



olarak bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada elde edilen yem Zn düzeylerinin koyunların sağlıklı beslenmesi için gereken düzeylerde olduğu düşünülmektedir.

Bakır, (Kies ve Harms 1989), Zn (Maret 2000) ve Cd (Kirchgessner ve ark. 1982) un Se ile etkileşimi bildirilmesine rağmen, sunulan çalışmada koyunlarda Gölbaşı grubu 45. günde Se ve Zn düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon ( $r=0,552$ ,  $p<0,05$ ) dışında, ilgili iz elementler arasında önemli bir korelasyona rastlanılmadı (veriler tablolaştırılmadı).

Kuzey İspanya bölgesinde orta derecede toksik metallerle kirlendiği saptanan alanda yaklaşık 78 koyunla yapılan çalışmada kan serumu Cd ölçümlerinde ortalama  $0,403 \mu\text{g/L}$  gibi oldukça yüksek bir değer ortaya çıkmıştır. Or ve ark. (2005) tarafından sanayi bölgesi olarak ifade edilen ve aynı zamanda koyunculuk yapılan alanlarda gerçekleştirilen ve ülkemizin kuzeybatı bölgelerini kapsayan bir çalışmada, koyun kan serumlarında  $0,02-0,21 \mu\text{g/L}$ , içme suyu örneklerinde  $0,05-1,23 \mu\text{g/L}$ , mera bitki örneklerinde  $0,45-1,04 \mu\text{g/kg}$  ve bölge toprak örneklerinde  $0,21-1,45 \mu\text{g/kg}$  sınırlarında değişen ve bulgularımıza göre oldukça yüksek değerlerde bulunan Cd konsantrasyonları saptanmıştır. Bu bulgular ışığında, çalışmamızdaki yem, su, toprak Cd düzeylerinin oldukça düşük düzeyde kaldığı ve tespit edilen değerlerin hayvan yemlerinde olmasına izin verilen kabul edilebilir Cd limitlerinin altında olduğu da dikkate alındığında, ölçülen Cd değerlerinin bölgemizdeki Se eksikliği ve buna bağlı problemlerin ortaya çıkışında öncelikli bir sırada olamayacağı değerlendirildi. Sığırlarda yapılan bir çalışmada (Tomza-Marciniak ve ark. 2011) serum Se ile serum Cd düzeyleri arasında negatif korelasyon bildirilmesine karşın, sunulan çalışmada serum Se ve Cd arasında bir korelasyon belirlenmedi.

## SONUÇ

Yem materyalleri dikkate alındığında, ortalama referans değerler altında kalan düşük iz element düzeylerinin saman, ot, yonca gibi mera gıdalarında, ortalama referans değerlere yakın ya da yüksek iz element düzeylerinin karma ve pelet yemlerde analizlendiği görülmektedir. Bu durum, bölgede mera besisi yapılan hayvanlarda rasyona konsantre yem ve iz element mineral desteği yapılmamasının hayvanlarda muhtemel iz element noksanlıklarının ortaya çıkmasında önemli olabileceğini düşündürmektedir. Mera yemlerindeki Cu, Zn ve

Se düzeylerinin, referans düzeylerden düşük olmasına rağmen Kontrol grubu yanı sıra Polatlı ve Beypazarı koyunlarında klinik herhangi bir belirti ortaya çıkmaması karma ve pelet yem takviyesinin yanı sıra hayvanlara oral ya da parenteral iz element uygulamalarının yapıldığı yönünde yorumlandı. Bu çalışmalar sonucunda, yem bitkilerinin mineral madde düzeylerinin aynı ildeki örnek alınan pilot bölgeler arasında bile değişken olabildiği; yem bitkilerindeki bölgesel iz element fazlalığı veya noksanlığının aynı bölgede yetiştirilen koyunlarda klinik herhangi bir belirti ortaya çıkarmadığı saptanmıştır. Sonuç olarak tüm bu bulgu ve değerlendirmeler dikkate alındığında mera, yem ve su kaynaklarımızın Se açısından fakir olduğu ve entansif besleme söz konusu olmadığında eksiklik ve bağlı problemlerin olacağı öngörülmektedir. Bölgede sadece mera besisi yeterli gelmemekte, kesif yem yanı sıra oral ya da parenteral iz element ve vitamin takviyesinin yapılması gerekmektedir. Takviyelerin yapılmadığı/yetersiz yapıldığı işletmelerde hayvanlarda iz element yetersizlikleri kaçınılmaz olacaktır.

Ancak yapılan iz element mineral madde desteklemelerine rağmen yine de ortaya çıkabilen Se eksikliğine yönelik klasik çalışmaların yanı sıra biyolojik sistemlerde element davranışlarını da kapsayan yeni çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır ve çalışmalar bu boyutu ile de detaylandırılmalıdır.

## TEŞEKKÜRLER

Çalışma, TAGEM tarafından TAGEM/HSGYAD/14/A07/P02/44 proje numarası ile desteklenmiştir.

## KAYNAKLAR

- Abd El-Ghany H, L.Pez-Arellano AE, Revilla-V.Zquez R, Ram. Rez-Bribiesca A. T.Rtora-Pérez EJ. (2008). J Anim Vet Adv 7: 61-67.
- Agnieszka T, Bogumiła M, Małgorzata P, Bąkowska R, Pilarczyk Wójcik J, Marciniak A, Hendzel D. (2011). Relationship between selenium and selected heavy metals concentration in serum of cattle from a non-polluted area. Biological Trace Element Research 144: 517-524.
- Alp M, Kahraman R, Kocabağlı N, Özçelik D, Eren M, Türkmen İ, Yavuz M, Dursun Ş. (2001). Marmara bölgesindeki yem

- bitkilerinin mineral madde düzeylerinin saptanması ve koyunlarda beslenme bozuklukları ile ilişkisi. *Turk J Vet Anim Sci* 25:511-520.
- Anon. (2004). MWS-2. Temassız sıcaklık ölçümüne sahip mikrodalga parçalama sistemi. V.3.0 Kullanma Talimatı. Berghof Products + Instruments GmbH.
- Aoac Official Method. 999.10 Lead, Cadmium, Zinc, Copper, and Iron in Foods Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion.
- Ateşşahin A. (1999). Deneysel olarak selenyum zehirlenmesi oluşturulan koyunlarda kan ve doku selenyum düzeylerinin belirlenmesi. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı.
- Aydın K. (1997). Bir endemik guatr bölgesindeki ilkökul çocuklarında iyot ve selenyum düzeylerinin tiroid volümü, tiroid fonksiyonları, fizik ve zeka gelişimi üzerine etkileri. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi.
- Baydar E, Özçelik M, Gazioğlu A. (2015). Yün yeme hastalığı olan koyunlarda bazı iz elementler ve serum biyokimyası. *FÜ Sağ Bil Vet Derg* 29:187-190.
- Bektaş Gİ, Altıntaş A. (2011). Merinos ve Ile de France x Akkaraman sütlerinde iz element düzeyleri ve laktasyondaki değişimleri. *Türk Biyokimya Dergisi* 36:149-153.
- Bostedt H, SCHRAMEL P. (1990). The importance of selenium in the prenatal and postnatal development of calves and lambs. *Biological Trace Element Research* 24:163-171.
- Combs FG, ve Combs BS. (1984). The nutritional biochemistry of selenium. *Ann Rev Nutr* 4:257-280.
- Davis PA, Mc Dowell LR, Wilkinson NS, Buergelt CD, Van Alstyne R, Weldon RN, Marshall TT. (2006). Effects of selenium levels in ewe diets on selenium in milk and the plasma and tissue selenium concentrations of lambs. *Small Ruminant Research* 65:14-23.
- Erman M, Abdullah K, Kızılar AR, Parkan Ç, Gönül R, Barutçu B, Dodurka HT. (2005). Determination of levels of some essential (iron, copper, zinc) and toxic (lead, cadmium) metals in the blood of sheep and in samples of water, plants and soil in Northwest Turkey. *Veterinarski Arhiv* 75 (4):359-368.
- Food and Drug Administration, FDA. (1987). Food additives permitted in feed and drinking water of animals: Selenium. *Fed Reg* 52, 10668.
- Food and Drug Administration, FDA. (1987). Food additives permitted in feed and drinking water of animals: Selenium. *Fed Reg*, 52, 10668.
- Gerloff BJ. (1992). Effect of selenium supplementation on dairy cattle. *J Anim Sci* 70: 3934-3940.
- Gürdoğan F, Yıldız A, Balıkcı E. (2004). Investigation of Serum Cu, Zn, Fe and Se Concentrations during Pregnancy (60, 100 and 150 Days) and after Parturition (45 Days) in Single and Twin Pregnant Sheep. *Turk J Vet Anim Sci* 30 2006:61-64.
- Jelinek P, Illekl J, Helanova I, Frais Z. (1984). Biochemical and hematological values of the blood in rams during rearing. *Cta Vet. Brno* 3-4;143-150.
- Jensen L. (1975). Modification of a selenium toxicity in chicks by dietary silver and copper. *J Nutr* 105;769, 1975.
- Judson GJ, McGregor BA, Howse AM. (2011). Blood mineral, trace-element and vitamin concentrations in Huacaya alpacas and Merino sheep grazing the same pasture. *Animal Production Science* 51:873-880.
- Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML. (1997). *Clinical Biochemistry in Domestic Animals*, 5th Edition, Academic Press, California, USA.
- Kies C, Harms JM. (1989). Copper absorption as affected by supplemental calcium, magnesium, manganese, selenium and potassium. *Adv Exp Med Biol* 258:45-58.
- Kirchgessner M, Schwarz FJ, Schnegg A. (1982). Interactions of essential metals in human physiology. In: ed: Prasad AS. *Current Topics in Nutrition and Disease Vol. 6, Clinical, Biochemical, and Nutritional Aspects of Trace Elements*, New York.
- Küçükaya F. (2010). Organik iz minerallerin büyüme performansına etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Maret W. (2000). The function of zinc metallothionein: a link between cellular zinc and redox state. *J Nutr* 130:1455-1458.
- Milad K, Kovac G. (1998). Review article: Vitamin E and selenium in sheep. *Folia Veterinaria* 42:87-94.
- N M L K 186. (2007). Nordic Committee on Food Analysis, Trace Elements As, Cd, Hg, Pb and other elements. Determination by ICP-MS after pressure digestion.
- Özçelik M, Kabadayı B, Güler O, Orak U, Çiftçi M. (2015). Elazığ ilinde koyunlarda mera öncesi, mera dönemi ve mera

- sonrası kan serumlarında bazı mineral madde düzeylerinin tespiti. FÜ Sağ Bil Vet Derg 29 (3):167-173.
- Perrone L, Di Palma L, Di Toro R, Gialanella G, Moro R. (1993). Trace element content of human milk during lactation. JTrace Elem Electrolytes Health Dis 7:245-7.
- Phipps RH, Grandison AS, Jones AK, Juniper DT, Ramos-Morales ER, Bertin G. (2008). Selenium supplementation of lactating dairy cows: effects on milk production and total selenium content and speciation in blood, milk and cheese. Animal 2:1610-1618.
- Robson S. (2007). Selenium deficiency in sheep. Erişim: [http://www.dpi.nsw.gov.au/\\_\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0016/111355/selenium-deficiency-in-sheep.pdf](http://www.dpi.nsw.gov.au/___data/assets/pdf_file/0016/111355/selenium-deficiency-in-sheep.pdf), erişim tarihi: 04.01.2013.
- Rossipal E, Krachler M. (1998). Pattern of trace elements in human milk during the course of lactation. Nutrition Research 18: 11-24.
- Shamberger JR. (1983). Biochemistry of selenium. Plenum Press. New York and London.
- Stacchini A, Coni E, Baldini M. (1989). Selenium intake with diet in Italy: a pilot study. J Trace Elem Electrolytes Health Dis 3:193-198.
- Toker NY. (2007). Blood serum Vitamin A and E concentrations and distribution into lipoprotein fractions of pregnant sheep and newborn lambs. Revue Med Vet 158: 413-417.
- Turgut K. (1995). Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis. Bahçıvanlar basımevi. Cilt 1:188-189.
- Underwood EJ. (1977). Trace elements in human and animal nutrition. Academic Press 4th edition.
- Van Niekerk FE, Van Niekerk CH. (1990). Concentrations of plasma copper and zinc and blood selenium in ewes and lambs of Merino, Dohne Merino and SA Mutton Merino sheep. S Afr Tydskr Veek 20:144-147.
- Voyvoda H, Sekin S, Vur F, Bildik A. (1996). Van'daki Kuzularda Beyaz Kas Hastalığı ve Enzootik Ataksi'nin Kombine Olarak Görülebilirliği. Y Y Ü Vet Fak Derg 7:35-41.
- Watkinson JH. (1983). Prevention of selenium deficiency in grazing animals by annual topdressing of pasture with sodium selenate. New Zealand Veterinary Journal 31:78-85.
- Wichtel JJ, Craigie AL, Freeman DA, Varela-Alvarez H, Williamson NB. (1996). J Dairy Sc. 79:1865-1872.

## Investigation of TAS and TOS Levels in Sheep with Hydatid Cyst

Handan MERT<sup>1</sup>, Semih YAŞAR<sup>2</sup>, Nihat MERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>2</sup>Department of Medical Laboratory Technics, Özalp Vocational High School, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

### ABSTRACT

*Echinococcus granulosus* is a larval form of the hydatid cyst is a parasitic zoonosis commonly seen in animals and humans. The disease is endemic in Turkey is still far leads to substantial economic losses. In this study, TAS and TOS levels will be determined in cyst hydatite sheep and the changes of these biochemical parameters in cystic echinococcosis were investigated. The material of the study was composed of 2-3 aged Morkaraman sheep which were slaughtered and slaughter house in the Özalp district of Van province. The general health status of the sheep before slaughtering was checked by physical examination and blood samples were taken. After slaughtered, cyst hydatid examination was performed in different organs of the animals. The experimental group (cystic group) of the 25 sheep study with a positive (fertile cyst) of protoscolex, and 15 sheep with no pathological lesion on organ examinations and healthy physical examination were the control group. Serum samples were taken from healthy and blood samples taken from animals infected with hydatid cyst. TAS and TOS levels in serum samples were determined by spectroscopic methods using commercial kits. In control group sheep had TAS  $1.67 \pm 0.04$  mmol trolox Equiv./L and in sheep infected with cystic echinococcosis was  $1.44 \pm 0.05$  mmol trolox Equiv./L ( $p < 0.01$ ), TOS levels were  $4.46 \pm 0.58$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L in the control group and  $6.94 \pm 0.59$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L in the cystic echinococcosis group ( $p < 0.001$ ). OSI values were  $0.27 \pm 0.08$  Arbitrary Unit in the control group and  $0.48 \pm 0.05$  Arbitrary Unit in sheep infected with cystic echinococcosis. As a result of the migration of phagocytic cells to the cystic region, lipid peroxidation occurs due to the use of more oxygen. As a result, TAS levels decreased and TOS levels increased in sheep with hydatid cysts.

**Key words:** Echinococcus, TAS, TOS, Sheep.

## Kist Hidatitli Koyunlarda TAS ve TOS Düzeylerinin İncelenmesi

### ÖZET

Etkeni *Echinococcus granulosus*'ün larval formu olan kist hidatik hayvanlarda ve insanlarda yaygın olarak görülen paraziter bir zoonozdur. Hastalık, Türkiye'de halen endemik olarak seyretmekte olup oldukça önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Bu çalışmada, kist hidatitli koyunlarda TAS ve TOS düzeyleri tespit edilerek, bu biyokimyasal parametrelerin kistik ekinokokozisteki değişimleri araştırıldı. Araştırmanın materyalini, Van ili Özalp ilçesinde mezbahaneye getirilen ve kesimi yapılan 2-3 yaşlı Morkaraman koyunlar oluşturdu. Kesim öncesi koyunların genel sağlık durumları fiziki muayene ile kontrol edilerek kan örnekleri alındı. Kesim sonrası hayvanların değişik organlarında kist hidatik muayenesi yapıldı. Protoskoleks yönünden pozitif (fertil kist) olan 25 adet koyun çalışmanın deneme grubunu (kistik grup), organ muayenelerinde herhangi bir patolojik lezyon bulunmayan ve fiziki muayenede sağlıklı görünen 15 adet koyun ise kontrol grubunu oluşturdu. Sağlıklı ve kist hidatik ile enfekte hayvanlardan alınan kan örneklerinin serumları ayrıldı. Serum örneklerinde TAS ve TOS düzeyleri Spektroskopik metodlar ile ticari kitler kullanılarak belirlendi. Kontrol grubu koyunlarda TAS  $1.67 \pm 0.04$  mmol trolox Equiv./L, kistik ekinokokozis ile enfekte koyunlarda  $1.44 \pm 0.05$  mmol trolox Equiv./L ( $p < 0.01$ ) olarak saptanırken TOS düzeyleri kontrol grubunda  $4.46 \pm 0.58$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L, kistik ekinokokozisli grupta  $6.94 \pm 0.59$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  equiv./L olarak bulundu ( $p < 0.001$ ). OSI değeri ise kontrol grubunda  $0.27 \pm 0.08$  kistik ekinokokozis ile enfekte koyunlarda  $0.48 \pm 0.05$  Arbitrary Unit olarak hesaplandı. Fagositik hücrelerin kistik bölgeye göçü sonucu aktivitelerine bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Bunun sonucunda hidatik kistli koyunlarda TAS düzeylerinde azalma, TOS düzeylerinde ise artma gözlemlendi.

**Anahtar kelimeler:** Ekinokok, Koyun, TAS, TOS.

## GİRİŞ

Kistik ekinokokkozis, *Echinococcus granulosus* (*E. Granulosus*) larvalarının ara konaklara yerleşip gelişmesi sonucu oluşan, Türkiye’de ve dünyada hayvan ve insan sağlığını önemli derecede tehdit eden paraziter zoonoz bir hastalıktır. Ülkemizde bu hastalık, hayvan türlerinin bölgelere göre farklılık göstermesi, iklim koşulları, toplumun sosyal ve ekonomik açıdan gelişmişlik düzeyleri gibi sebeplere bağlı olarak geniş bir yayılma alanı göstermektedir (Güralp 1981).

Konaklar erişkin parazitleri bağırsaklarında bulundurur ve dışkı ile atılan *E. granulosus* yumurtaları insanlarda ve doğal ara konaklar olan sığır, keçi, koyun gibi değişik hayvanlarda enfeksiyona neden olmaktadır. Hastalık en fazla karaciğer olmak üzere; beyin, dalak, böbrek, kalp, kemik gibi organlarda etkiler göstermektedir (Mert ve Güler 1991; Ersayit 2009).

Bu hastalığın insan ve hayvanlara en önemli bulaşma kaynağı parazit ile enfekte olan köpeklerdir. Bir toplumdaki kist hidatik yaygınlığının toplum bünyesinde var olan köpeklerdeki parazit enfeksiyonları ile doğrudan bir ilişkisi bulunmaktadır. Şili, Yeni Zelanda, Kıbrıs, Avustralya gibi ülkeler, parazit ile verdikleri mücadele kapsamında enfekte olan köpeklere düzenli tedaviler uygulayarak, insanlarda kist hidatik vakalarında önemli düşüşler sağlamışlardır (Economides ve ark. 1998).

Kist hidatik insanlar için ekonomik ve sosyal kayıplara sebep olan bir hastalıktır. Bun kayıplar arasında, hastalığın tanı harcamaları, ameliyat giderleri, hastanede tedavi ve ilaç giderleri, ulaşım masrafları, verim ve iş gücü kayıpları, bireyin yaşamsal verimliliğin azalması sayılabilir (Altıntaş ve ark. 2004).

Organizmada oksidan ile antioksidan maddeler arasındaki dengenin oksidan maddeler lehine bozulması olayına oksidatif stres adı verilir. Bu durum canlı için patolojiktir. Bu dengesizlik sonucu oluşan oksidatif stresin toplamı, total oksidatif stres ya da total oksidan seviye/status (TOS) olarak gösterilir. Oksidatif stres durumu aşırı reaktif oksijen ya da nitrojen maddelerin vücutta üretimi ile veya antioksidan tampon sistemlerinin düzgün çalışmaması sonucu meydana gelir. Total antioksidan kapasitesi (TAS) vücutta mevcut olan antioksidan maddelerin hücrel membranları ve başka hücrel yapıları oksidanların hasarına karşı koruma ve oksidanların oluşumunu önleme kapasitesinin bir göstergesidir (Mac Kinnon ve ark. 1999).

Total antioksidan seviyesinin tesbiti, antioksidan maddelerin tek tek ölçülmesinden daha doğru bilgiler verebilir. Çünkü TAS, serumda bulunan antioksidan özellik gösteren tüm maddelerin toplam aktivitesini ortaya koyar (Erel 2004).

Eşlenmemiş elektron taşımakta olan atom ya da atom grupları serbest radikal olarak isimlendirilir. Konak savunmasının ve doku hasarının önemli mediyatörlerinden biri oksijen radikalleridir. Serbest radikallerin oluşturacağı zararlı etkilerine karşı enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri korunma amaçlı hücrelerce kullanılır. Serbest oksijen radikalleri özellikle; glutatyon peroksidaz (GSH-Px), süperoksid dismutaz (SOD), katalaz gibi enzimatik olan ve  $\alpha$ -tokoferol, glutatyon, C-vitamini ve karotenoidler gibi nonenzimatik çeşitli antioksidanlar tarafından uzaklaştırılabilir. Serbest radikallerin üretiminin artması ve hazır bulunan antioksidan yapılar arasında oluşan dengesizlik oksidatif strese neden olmaktadır (Miller ve ark. 1993).

Serbest radikaller aracılığı ile oluşan hücre hasarında en önemli yollardan biri membranlarda bulunan lipidlerin peroksidasyona uğramasıdır. Lipid peroksidasyonu sonucunda membran üzerinde yapısal ve fonksiyonel hücre hasarı meydana gelir. (Grisotto ve ark. 2000; Marnett 2002).

Parazitin bulunduğu konak immün sisteminde savunma, hücreler vasıtası ile yapılır. Bu savunma sisteminde aktive olmuş fagositer hücreler tarafından üretilen farklı sitotoksik ajanlar; reaktif oksijen ve nitrojen ara ürünleri bulunmaktadır. Oluşan bu ürünler serbest radikal yapısında oksidan moleküllerdir ve parazit viabilitesini kötü yönde etkilemektedir. Parazitik canlılar, oksidan ajanların temizlenmesi için enzimatik olan (glutatyon peroksidaz, superoksid dismutaz ve katalaz vb.) ve enzimatik olmayan (vitamin C, vitamin E, glutatyon, tiyoller vb.) antioksidan yapılardan en az bir veya birkaç tanesini içermektedir (Barret 1981). Bununla birlikte, hidatik kistler biyokimyasal açıdan birçok yönleriyle araştırılmış olmasına rağmen, hidatik kistlerin gelişimi ile oksidanların ve antioksidanların rolünü ortaya koyan bilgilerin yeterli düzeyde olmadığı görülmektedir (Gottstein 1992).

Bu çalışmada koyun serumlarında TAS ve TOS düzeyleri ölçülerek, ekinokok kistli hayvanlardaki biyokimyasal değişimlerin incelenmesi amaçlandı.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmanın materyalini Van ili Özalp ilçesinde mezbahaneye getirilen 2-3 yaşlı Morkaraman koyunlar oluşturdu. Kesim öncesi koyunların genel sağlık durumları fiziki muayene ile kontrol edilerek kan örnekleri alındı. Kesim sonrası hayvanların değişik organlarında kist hidatit muayenesi yapıldı. Protoskoleks yönünden pozitif (fertil kist) olan 25 adet koyun çalışmanın kistik grubunu, organ muayenelerinde herhangi bir patolojik lezyon bulunmayan ve fiziki muayenede sağlıklı görünen 15 adet koyun ise kontrol grubunu oluşturdu. Alınan kan örnekleri +4 °C'da laboratuvara taşındı ve 3000 rpm'de +4 °C'da 10 dakika santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Koyun kanlarına ait serum örneklerinde TAS (Erel 2004) ve TOS (Erel 2005) düzeyleri spektroskopik metotlar ile ticari kitler kullanılarak belirlendi.

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 20.0 Windows programı (SPSS Inc., Chicago, IL) kullanıldı. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesinde bağımsız T testi kullanıldı ve sonuçlar ortalama  $\pm$  SE (standart hata) olarak verildi. İstatistiksel anlamlılık için  $p < 0.01$  anlamlı olarak kabul edildi.

## BULGULAR

Araştırmanın tamamlanması ile ölçüm yapılan parametrelerin ortalamaları gruplar bazında tablolandırıldı. Kontrol ve kistik grupların TAS ve TOS ortalamaları istatistiksel olarak yorumlandı. TAS değerleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak ( $p < 0.01$ ) önemli bulunurken, TOS düzeyleri farklılığı ( $p < 0.001$ ) önemli bulundu. OSI (Oksidatif stres indeksi) de ( $p < 0.001$ ) önemli bulundu.

**Tablo 1.** Ekinokok kistli ve sağlıklı koyunların serum TAS, TOS ve OSI düzeyleri

Parametreler	Kontrol Grubu ( $\bar{X} \pm SE$ ) (n=15)	Kistik Grubu ( $\bar{X} \pm SE$ ) (n=25)	
TAS (mmol trolox Equiv./L)	1.67 $\pm$ 0.04	1.44 $\pm$ 0.05	$p < 0.01$
TOS ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equiv./L)	4.46 $\pm$ 0.58	6.94 $\pm$ 0.59	$p < 0.001$
OSI (Arbitrary Unit)	0.27 $\pm$ 0.08	0.48 $\pm$ 0.05	$p < 0.001$

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Canlılığını devam ettiren aktif kistler, konak canlıda yangıya sebep olacağı için konakta bulunan nonspesifik immun koruma sisteminden çıkan reaktif oksijen türlerinin oluşturacağı toksik etkilerine karşı enzimatik olan ve enzimatik olmayan antioksidanları yapılarında bulundurabilirler. Hidatik kist sıvısında yaşamlarını devam ettiren paraziter canlılar büyüme ve gelişimleri için konak canlıya ait pek çok metaboliti kullanabildiği bildirilmektedir (Jansen ve ark. 1991; Frayha ve Haddat 1980).

Pek çok hastalığın patogenezinde oksidatif stres rol almaktadır (Miller ve ark. 1993). Parazit enfeksiyonlarında konakçı organizma, oksidatif strese neden olan serbest radikaller vasıtasıyla parazitlere karşı tepki mekanizması oluşturur (Woodbury ve ark. 1984). Parazitin bulaştığı hayvanlarda oksidatif stres oluştuğuna dair birçok çalışma bulunmaktadır (Sanchez-Campos ve ark. 1999; Derda ve ark. 2004; Şimşek ve ark. 2006; Saleh 2008; Saleh ve ark. 2009). Serbest radikallerden biri olan NO, konakçı savunmada ekinokok kökenli enfeksiyonlara karşı önemli olarak kullanılırken fazla miktarda üretildiğinde oksidatif hasara sebep olabilmektedir (Zeghir-Bouteldja ve ark. 2009). Oksidatif stresin oluştuğu, kist hidatik teşhisi bırakılan insanlarda ve çeşitli hayvanlarda yapılan çalışmalar ile bildirilmiştir (Koltas ve ark. 2006; Ersayit ve ark. 2009; Kılıç ve ark. 2010; Heidarpour ve ark. 2012; Hanedan ve ark. 2015).

Fagositik hücrelerin kistik bölgeye göçü sonucu aktivitelerine bağlı olarak daha fazla oksijen kullanılmasıyla lipid peroksidasyonu oluşmaktadır. Çalışmamızda belirlediğimiz TAS ve TOS düzeyleri yapılmış diğer çalışmalarla paralel olarak hidatik kistli koyunlarda TAS düzeylerinde azalma, TOS düzeylerinde ise artma şeklinde gözlenmiştir.

Sonuç olarak kist hidatitli koyunlarda saptanan oksidan durumdaki artış yarattığı oksidatif stresle organizmalarda birçok biyokimyasal hasarın oluşmasına neden olur. Böylece hayvanların genel sağlık durumu bozulur, her türlü bakteriyel, fungal ve viral invazyonlara predispose hale gelir. Üreticilerin ve klinisyenlerin hayvanlarda verimi düşürerek ekonomik zararlara neden olan bu hastalığa karşı profilaktif çalışmalara, toplum sağlığı için büyük risk olan hidatik kistin yayılmasının durdurulmasına önem vermesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- Altıntaş N, Tınar R, Çoker A. (2004). Echinococcosis. Hidatidoloji Derneği Yayın No:1, Ege Üniversitesi matbaası, Bornova, İzmir.
- Barret J. (1981). Biochemistry of parasitic helminth's. Macmillan Publishers Ltd; p.65-250. London.
- Derda M, Wandurska-Nowak E, Hadas E. (2004). Changes in the level of antioxidants in the blood from mice infected with *Trichinella spiralis*. Parasitol. Res., 93: 207-210.
- Economides P, Christofia G, Gemmell MA. (1998). Control of *Echinococcus granulosus* in Cyprus and comparison with other island models. Vet Parasitol, 79: 151-163.
- Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem, 37(4): 277-85.
- Erel O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin Biochem, 38(12): 1103-11.
- Ersayit D, Kilic E, Yazar S, Artis T. (2009). Oxidative stress in patients with cystic echinococcosis: relationship between oxidant and antioxidant parameters. Sağlık Bil. Dergisi, 18: 159-166.
- Ersayit D. (2009). Kistik Ekinokokkozisli Hastalarda Oksidatif Stres: Oksidan Ve Antioksidan Parametreler Arasındaki İlişki. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Yüksek Lisans Tezi.
- Frayha GJ, Haddat R. (1980). Comparative chemical composition of protoscolices and hydatid cyst fluid of *E. granulosus*. Int J Parasitol, 10: 359-64
- Gottstein B. (1992). Molecular and immunological diagnosis of Echinococcosis. Clin Microbiol Rev, 5: 248-261.
- Grisotto PC, Dos Santos AC, Continho-Netto J, Cherri J, Piccinato C. (2000). Indicators of oxidative injury and alterations of the cell membrane in the skeletal muscle of rats submitted to ischemia and reperfusion. J Surg Res, 92: 1-6.
- Güralp N. (1981). Helmintoloji (2 baskı). Ankara Üniv Vet Fak Yayınları, Ankara.
- Hanedan B, Kirbas A, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kilic K, Benzer F. (2015). Arginase activity and total oxidant/antioxidant capacity in cows with lung cystic echinococcosis. Med Weter, 71(3): 167-170.
- Heidarpour M, Mohri M, Borji H, Moghdass E. (2012). Oxidative stress and trace elements in camel (*Camelus dromedarius*) with liver cystic echinococcosis. Vet Parasitol, 187: 459-463.
- Jansen D, Rueda M, De Rycke PH, Osuna A. (1991). Host parasite relationship in hydatidosis: Comparative analysis of hydatid cyst fluid and sheep serum. Belgium J Zool, 121(2): 179-91.
- Kılıç E, Yazar S, Başkol G, Artış T, Ersayit D. (2010). Antioxidant and nitric oxide status in patients diagnosed with *Echinococcus granulosus*. Afr J Microbiol Res, 4:2439-2443.
- Koltas IS, Yucebilgic G, Biligin R, Parsak CK, Sakman G. (2006). Serum malondialdehyde level in patients with cystic echinococcosis. Saudi Med J, 27: 1703-1705.
- Mac Kinnon KL, Molnar Z, Lowe D, Watson ID, Shearer E. (1999). Measures of total free radical activity in critically ill patients. Clin Biochem, 32(4):263-8.
- Marnett L. (2002). Oxy radicals, lipid peroxidation and DNA damage. Toxicology, 181(2): 219-222.
- Mert N, Güler AH. (1991). Kist hidatid sıvılarının biyokimyasal içeriği III. Elektrolitler, Ulu Vet Fak Derg, 10: 29-32.
- Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska E, Madsen FC. (1993). Oxidative stress, antioxidants, and animal function. J Dairy Sci, 76: 2812-2823.
- Saleh MA, Al-Salahy MB, Sanousi SA. (2009). Oxidative stress in blood of camels (*Camelus dromedaries*) naturally infected with *Trypanosoma evansi*. Vet Parasitol, 162: 192-199.
- Saleh MA. (2008). Circulating oxidative stress status in desert sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. Vet Parasitol, 154: 262-269.
- Sanchez-Campos S, Tunon MJ, Gonzales P, Gonzales-Gallego J. (1999). Oxidative stress and changes in liver antioxidant enzymes induced by experimental dicrocoeliosis in hamsters. Parasitol Res, 85: 468-474.
- Şimşek S, Yuce A, Utuk AE. (2006). Determination of serum malondialdehyde levels in sheep naturally infected with *Dicrocoelium dendriticum*. F U Sağlık Bil Dergisi, 20, 217-220.
- Woodbury RG, Miller HRP, Huntley JF, Newlands GFJ, Palliser AC, Wakelin D. (1984). Mucosal mast cells are functionally

active during spontaneous expulsion of intestinal nematode infections in rat. *Nature*, 312: 450-452.

Zeghir-Bouteldja R, Amri M, Aitaissa S, Bouaziz S, Mezioug D, Touil-Boukoffa C. (2009). In vitro study of nitric oxide metabolites effects on human hydatid of *Echinococcus granulosus*. *J Parasitol Res*, <http://dx.doi.org/10.1155/2009/624919>.



## In Vitro Evaluation of The Effect of Vitamin C on Necrosis and Autophagy Caused by Ionizing Radiation

Semiha DEDE<sup>1</sup>, Veysel YÜKSEK<sup>2</sup>, Osman YILMAZ<sup>3</sup>, Sedat ÇETİN<sup>1</sup>, Ayşe Usta<sup>4</sup>, Mehtap GÜNEY<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>2</sup>Özalp Vocational High School, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>4</sup>Department of Chemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>5</sup>Department Of Animal Nutrition And Nutritional Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

### ABSTRACT

This study was planned to investigate the possible protective effect of Vitamin C on the ionized radiation induced necrotic and autophagic pathways as in vitro. The NRK-52E renal epithelial cells were cultured (RPMI 1640 medium (10% FBS, 1% L-Glutamine (2mM) and 1% Penicillin/Streptomycin). The proliferation-enhancing concentration of Vitamin C (100 µM) was used. In this study 5 groups were designed (Control, Ionizing Radiation, Vitamin C, Ionizing Radiation+Vitamin C, Vitamin C+Ionizing Radiation). The ionizing radiation groups were exposed 8 Gy ionizing radiation. Total RNA and cDNA were isolated from the samples collected from the incubated cells for 24 hours, and expression levels of target genes were determined by RT-PCR. According to the control gene by RT-PCR; the expression levels of necrotic (RIPK 1, RIPK3) and autophagic (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) target genes were determined. In the radiation group, necrotic and autophagic genes were found to be significantly increased compared to control group. The vitamin C supplementation after radiation decreased genes expression of all genes except Map3A gene. As a result, it was noted that ionizing radiation affects necrotic and autophagic cell pathways in the NRK-52E cell line, and activate cytotoxic mechanism. Vitamin C leads to down regulation for necrotic and autophagic genes, except for Map3A before and after ionized radiation administration. It was considered that the effects of vitamin C on cytotoxicity due to ionizing radiation are worth investigating.

**Key words:** Autophagy, In vivo, Ionizing radiation, Necrosis, Vitamin C.

## İyonize Radyasyondan Kaynaklanan Nekroz ve Otofaji Üzerine Vitamin C'nin Etkisinin İn Vitro Olarak Değerlendirilmesi

### ÖZET

Bu çalışma, iyonize radyasyondan kaynaklanan nekrotik ve otofajik yollarda Vitamin C'nin olası koruyucu etkisinin in vitro olarak araştırılması amacıyla planlandı. Bu amaçla NRK-52E böbrek epitelyal hücre hattı kullanıldı. Hücreler (%10 FBS, %1 L-Glutamin (2mM) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren RPMI 1640) besi ortamında çoğaltıldı. Daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı. Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 çalışma grubu oluşturuldu. İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Bütün gruplar 24 saat inkübe edildikten sonra total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak, qRT-PCR ile kontrol genine göre; nekrotik (RIPK 1, RIPK3) ve otofajik (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) hedef genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Radyasyon grubunda nekrotik ve otofajik genlerin kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı bulundu. Radyasyona maruz kaldıktan sonra verilen vitamin C'nin, Map3A hariç tüm genlerin ekspresyonunu azalttığı saptandı. Sonuç olarak, iyonize radyasyonun NRK-52E hücre hattındaki nekrotik ve otofajik hücre yollarını etkilediği, sitotoksik mekanizmayı aktive ettiği ve Vitamin C'nin iyonize radyasyon uygulamasından önce ve sonra Map3A hariç, nekrotik ve otofajik genlerin down-regülasyonuna yol açtığı belirlendi. Vitamin C'nin iyonlaştırıcı radyasyona bağlı sitotoksisite üzerindeki etkilerinin araştırılmaya değer olduğu düşünülmektedir..

**Anahtar kelimeler:** Hücre kültürü, İyonize radyasyon, Nekroz, Otofaji, Vitamin C,

## GİRİŞ

İyonize radyasyon, gündelik hayattaki yaygın kullanımının yanı sıra pek çok hastalığın tanısı ve tedavisinde de kullanılmaktadır. Nispeten düşük dozlarda veya maruz kalma sürelerinde bile, hücreler ve dokular üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinen serbest radikallerin üretimine neden olur. Antioksidan vitaminler (E, C ve A), serbest radikal kaynaklı hücre yıkımına karşı koruyucu olarak önerilmektedirler (Halliwell 1994, Weiss 2000, Dede ve ark. 2003, Değer ve ark. 2003).

İyonize radyasyon, atomlar tarafından elektromanyetik dalgalar veya parçacıklar biçiminde salınan bir enerji türüdür. Bütün canlılar, doğal iyonlaştırıcı radyasyon kaynakları, x ışınları ve tıbbi cihaz kaynaklı radyasyona maruz kalınabilir. Tıp, sanayi, tarım ve bilimsel çalışmalar gibi faydalı yerlerde kullanılabilir. Uygun şekilde kullanılmadığında sağlık için tehlikeli olabilir. Radyasyon dozları belirli seviyeleri aştığında deri yanıkları, akut radyasyon sendromu gibi akut sağlık sorunları ortaya çıkabilir. İyonize radyasyon, DNA'da yaptığı hasara bağlı olarak hücre ölümüne neden olarak etki göstermektedir. İyonize radyasyon, apoptotik yolaktaki enzimleri de etkileyerek de etkili olmaktadır. Radyasyon, sıcaklık, hipoksi ve sitotoksik antikanser ilaçları gibi çeşitli zararlı uyarılar, düşük dozlarda apoptozis, yüksek dozlarda nekrozise sebep olabilir (Karslıoğlu ve ark. 2005, Taysi ve ark. 2008, Yılmaz ve ark. 2019).

Canlı organizmanın metabolik faaliyetlerinin normal seyrinde devam edebilmesi için oldukça önemli molekül olan vitaminler, enzimatik reaksiyonlarda koenzim olarak da görev yaparlar. Vitamin C, enzimatik reaksiyonlarda elektron vererek, indirgeyici ajan olarak direkt etki göstermektedir (Mc Dowell 2003, Gürdöl ve Ademoğlu 2013, Ferrier 2014). Vitaminlerin, özellikle vitamin C'nin radyasyondan kaynaklanan oksidatif stresten kaynaklanan hasarlara karşı, koruyucu rolünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Değer ve ark. 2003, Dede ve ark. 2009).

Bu çalışma, iyonize radyasyondan kaynaklanan nekroz ve otofaji üzerine vitamin C'nin koruyucu olarak etkili olup olmadığını in vitro değerlendirilmesi amacıyla planlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Çalışmada NRK-52E rat böbrek epitelyal hücre hattı (ATCC®CRL-1571™) kullanıldı. Hücreler in vitro koşullarda RPMI 1640 medyumda; %10 FBS, %1 L-glutamin, %1 penisilin/streptomisin, %95 nem ve %5 CO<sub>2</sub> inkübatör ortamında haftada iki-üç kez düzenli pasajları yapılarak çoğaltıldı. Hücrelerin 25 cm<sup>2</sup>'lik kültür flasklarına sayıları 2x10<sup>6</sup> olacak şekilde ekimi yapıldı.

Kontrol, İyonize Radyasyon, Vitamin C, İyonize Radyasyon+Vitamin C, Vitamin C+İyonize Radyasyon olmak üzere 5 grup oluşturuldu. Vitamin C gruplarına daha önce yapılan çalışmalarda belirlenen Vitamin C'nin proliferasyon artırıcı konsantrasyonu (100 µM) uygulandı (Yüksek ve ark. 2017). İyonize Radyasyon gruplarına 8 Gy iyonize radyasyon uygulandı. Işınlamalar, Cobalt-60 Teleterapi cihazında, gamma radyasyonu verilerek gerçekleştirildi.

Oluşturulan deney gruplarında 24 saat inkübe edilen hücrelerden total RNA ve cDNA izolasyonu yapılarak, nekrotik (RIPK 1, RIPK3) ve otofajik (ATG3, ATG5, BECN1, Map3A) hedef genlerin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı PCR ile ekspresyon düzeyleri tespit edildi. Ekspresyon analizlerinde kontrol geni olarak Gliseraldehit fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Her bir örnek için 3 tekrarlı Gerçek Zamanlı PCR yapıldı ve bir CT (cycle threshold) amplifikasyonların logaritmik fazının başlangıcı itibarıyla belirlendi. Ekspresyon analizlerinde 2-ΔΔCt formülasyonu kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılık kontrol (GAPDH) ekspresyonunun artış-azalış kat (fold changes) sayısı ile karşılaştırılıp değerlendirildi.

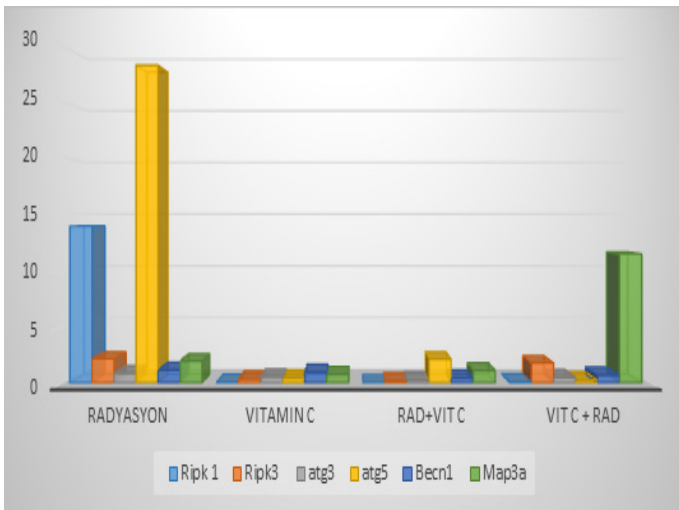
## BULGULAR

Çalışmadan elde edilen sonuçlar Tablo 1 ve Şekil 1'de gösterilmiştir.

Radyasyon grubunda yaklaşık olarak nekrotik RIPK 1 ve RIPK 3 genleri ve otofajik ATG5, BECN1, MAP3A genlerinin kontrole göre önemli oranda arttığı, radyasyon uygulanması sonrası vitamin C'nin tüm genlerin ekspresyonunu azalttığı görüldü. Vitamin C verilen gruplara radyasyon verilmesinin de, Map3A geni hariç benzer etkiyi gösterdiği, hatta ATG5 geninin ekspresyonunu daha da azalttığı tespit edildi.

**Tablo 1.** Gen Ekspresyonlarının Real Time - PCR Sonuçları

Çalışma Grubu	RİPK 1	RİPK3	ATG3	ATG5	BECN1	MAP3A
Kontrol	1	1	1	1	1	1
Radyasyon	13,928	2,143	0,852	28,246	1,156	1,958
Vitamin C	0,0480	0,348	0,514	0,429	0,946	0,757
Radyasyon+Vitamin C	0,0056	0,185	0,255	2,128	0,417	1,109
Vitamin C+ Radyasyon	0,092	1,790	0,460	0,248	0,697	11,471

**Şekil 1.** Gen Ekspresyonlarının Real Time - PCR Sonuçları

### TARTIŞMA VE SONUÇ

Önemli bir plazma antioksidanı olan Vitamin C, bir antioksidan olarak in vitro çalışmalarda da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Kang ve ark. 1998, Chen ve ark. 2005, Serbecic ve Beutelspacher 2005). Radyasyonun yıkıcı etkilerine karşı, vitamin takviyesinin antioksidan sistemi güçlendirerek olarak etkili olmaktadır (Dede ve ark. 2009)

Canlı organizmada doku ve organellerin lokal ve ani olarak ölümüne nekroz denir. Nekroz, rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreç olarak tanımlanmaktadır (Coşkun ve Özgür 2011). Vitamin C UVB radyasyon kaynaklı hücre hasarı üzerine DNA yıkımı, ROS üretimini engelleyerek koruyucu olduğu bildirilmektedir (Kawashima ve ark. 2018).

Otofaji, hasarlı hücre proteinleri ve organelleri ortadan kaldıran fizyolojik bir mekanizmadır. Böylece hücre içeriği parçalanarak geri dönüştürülebilir bir duruma gelmektedir.

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlaraya yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanması şeklinde seyretmektedir (Öz Arslan ve ark. 2011, Liman ve Suna 2017).

Radyasyona maruz kalınması ile ROS üretimi ve DNA yıkımı ile birlikte subsellüler organel yıkımı ve otofaji de meydana gelmektedir (Kim ve ark. 2019).

Bu çalışmada, iyonize radyasyonun NRK-52E hücre hattında nekrotik ve otofajik gen ekspresyonlarını artırarak, hücre yolaklarını etkilediği ve sitotoksik mekanizmanın aktif hale gelmesine neden olduğu belirlendi. İyonize radyasyondan kaynaklanan nekrotik ve otofajik hücre yıkımına karşı, radyasyon öncesi koruyucu olarak ve radyasyon sonrası tedavi edici olarak Vitamin C uygulamasının yararlı etkileri tespit edildi. Sonuç olarak, vitamin C'nin iyonize radyasyona bağlı gelişen sitotoksosite üzerine koruyucu ve terapötik rolünün araştırılmaya değer olduğu kanısına varıldı.

### KAYNAKLAR

- Chen L, Jia RH, Qui CJ, Ding G. (2005). Hyperglycemia inhibits the uptake of dehydroascorbate in tubular epithelial cell. *Am J Nephrol*, 25:459-65.
- Çoşkun G, Özgür H. (2011). Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv*, 20:145.
- Dede S, Deger Y, Kahraman T, Kılıçalp D. (2009). Effects of X-ray radiation on oxidation products of nitric oxide in rabbits treated with antioxidant compounds. *Turk J Biochem*, 34(1):15-8.
- Dede S, Değer Y, Mert N, Kahraman T, Alkan M, Keleş İ. (2003). Studies on the effects of X-ray on erythrocyte zinc and copper concentrations in rabbits after treatment with

- antioxidants. *Biol Trace Elem Res*, 92:55-60.
- Değer Y, Dede S, Belge A, Mert N, Kahraman T, Alkan M. (2003). Effects of X-ray radiation on lipid peroxidation and antioxidant systems in rabbits treated with antioxidant compounds. *Biol Trace Elem Res*, 94(2):149-56.
- Ferrier DR. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry*, 6nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2014.
- Gürdöl F, Ademoğlu E. *Biyokimya*, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2013.
- Halliwell B. (1994). Free radicals and antioxidants: A personal view. *Nutr Rev*, 52:253-65.
- Kang SA, Jang YJ, Park H. (1998). In vivo dual effects of vitamin C on paraquat-induced lung damage: Dependence on released metals from the damaged tissue. *Free Radic Res*, 28:93-107.
- Karslıoğlu I, Ertekin MV, Taysi S, Kocer I, Sezen O, Gepdiremen A, Koc M, Bakan N. (2005). Radioprotective effects of melatonin on radiation-induced cataract. *J Radiat Res*, 46:277-82.
- Kawashima S, Funakoshi T, Sato Y, Saito N, Ohsawa H, Kurita K, Nagata K, Yoshida M, Ishigami A. (2018). Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage. *Sci Re*, 8(1):16199.
- Kim W, Lee S, Seo D, Kim D, Kim K, Kim E, Kang J, Seong KM, Youn H, Youn B. Cellular stress responses in radiotherapy. *Cells*, 2019;8(9):E1105.
- Liman N, Suna DC. (2017). Hücre koruyucu bir mekanizma: Otofaji. *Erciyes Üniv Sağ Bil Derg*, 26:275-281.
- Mc Dowell LR. *Minerals in Animal and Human Nutrition*. 2nd ed. Elsevier Press, Amsterdam, Philadelphia, 2003.
- Öz Arslan D, Korkmaz G, Gözüaçık D. (2011). Otofaji: Bir hücrel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *Acıbadem Üniv Sağ Bil Derg*, 2:4.
- Serbecic N, Beutelspacher SC. (2005). Vitamins inhibit oxidant induced apoptosis of corneal endothelial cells. *Jpn J Ophthalmol*, 49:355-62.
- Taysi S, Memisogullari R, Koc M, Taylan A, Aslankurt M, Gümüştekin K, Al B, Ozabacigil F, Yılmaz A, Ozder HT. (2008). Melatonin reduces oxidative stress in the rat lens due to radiation-induced oxidative injury. *Int J Radiat Biol*, 84:803-8.
- Weiss JF, Landauer MR. (2000). Radioprotection by antioxidants. *Ann NY Acad Sci*, 899:44-60.
- Yılmaz O, Çetin S, Yüksek V, Dede S, Tuğrul T. The effect of vitamin C on apoptotic pathway in ionizing radiation-induced NRK-52E cell line. 2nd International Eurasian Conference on Biological and Chemical Sciences (Eurasian Bio Chem 2019), June 28-29, 2019 Ankara, Turkey, OP, 1872.
- Yüksek V, Dede S, Taşpınar M, Çetin S. (2017). The effects of vitamins A, D, E, and C on apoptosis and DNA damage in sodium fluoride-treated renal and osteoblast cell lines. *Fluoride*, 50(3):300-13.

## Some Oxidative Stress Parameters and Element Levels in Anaplasmosis Goats

Uğur ÖZDEK<sup>1</sup>, Bekir OĞUZ<sup>2</sup>, Yeter DEĞER<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Vocational School Of Health Service, Van Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>2</sup>Department of Parasitology, VFaculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Yüzüncü Yıl University, Van, TURKEY

### ABSTRACT

Anaplasmosis caused by *Anaplasma* species is an infectious disease in mammals in tropical and subtropical climatic regions. This study was performed to determine some oxidative stress parameters and element levels in naturally infected goats with anaplasmosis. The material of this study consisted of Hair goats aged 1.5-2 years who were brought to the Slaughterhouse of Van Metropolitan Municipality for slaughtering. Blood samples were collected from 91 goats. 35 goat infected groups diagnosed as anaplasmosis and 10 goat undiagnosed goats were used as healthy group after clinical and parasitological examination (giemsa stained peripheral blood frots and serological method (cELISA)). Blood was taken from the animal's vena jugularis. The blood samples were taken into anticoagulant tubes and centrifuged at 2000 rpm for 10 minutes. Serum malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels with catalase (CAT) enzyme activity were determined by spectrophotometric method and element (copper, iron, magnesium, potassium, zinc, sodium, manganese and calcium) analysis were performed in atomic absorption spectrometer (AAS, Thermo Scientific, Model: ICE-3000 series). Statistical analysis of the data was performed using SPSS 22 program (Mann-Whitney U test). It was observed that oxidative stress marker MDA level was significantly increased and GSH level with CAT enzyme activity decreased in infected goats compared to healthy group ( $P < 0.05$ ). However, it was found that copper and iron levels increased significantly and magnesium, potassium, zinc, sodium, manganese and calcium levels decreased in goats with anaplasmosis ( $P < 0.05$ ). Anaplasmosis goats showed significant changes in oxidative stress parameters and element levels. This finding may be useful in the diagnosis, prognosis and treatment of the disease.

**Key words:** Anaplasmosis, Element, Goat, Oxidative stress.

## Anaplasmosisli Keçilerde Bazı Oksidatif Stres Parametreleri ile Element Seviyeleri

### ÖZET

*Anaplasma* türlerinin meydana getirdiği anaplasmosis, tropik ve subtropik iklim bölgelerindeki memeli hayvanlarda görülen enfeksiyöz bir hastalıktır. Bu çalışma, anaplasmosis ile doğal enfekte keçilerde, bazı oksidatif stres parametreleri ile element düzeylerini tespit etmek için yapıldı. Bu çalışmanın materyalini Van Büyükşehir Belediyesi Mezbahanesine kesim için getirilen ortalama 1.5-2 yaşlarında Kıl keçisi oluşturdu. 91 keçiden alınan kan örneklerinin, klinik ve parazitolojik incelenmesi (giemsa boyalı perifer kan frotileri ve serolojik yöntem (cELISA)) sonucu anaplasmosis tanısı konulan 35 keçi enfekte grup ve tanı konulmayan 10 adet keçi sağlıklı grup olarak kullanıldı. Her bir hayvanın vena jugularisinden antikoagülanlı tüplere alınan kanlar 2000 rpm devirde 10 dk santrifüj edilerek serumları çıkarıldı. Elde edilen serumlarda malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyeleri ile katalaz (CAT) enzim aktivitesi spetkrofotometrik yöntemle, element (bakır, demir, magnezyum, potasyum, çinko, sodyum, mangan ve kalsiyum) analizi ise atomik absorpsiyon spektrometresinde (AAS, Thermo Scientific, Model: ICE-3000 series) yapıldı. Elde edilen verilerin, istatistik hesaplamaları SPSS 22 programı (Mann-Whitney U testi) kullanılarak yapıldı. Sağlıklı gruba göre, enfekte keçilerinde, oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesinin önemli oranda arttığı, GSH seviyesi ile CAT enzim aktivitesi ise azaldığı görüldü ( $P < 0.05$ ). Bununla birlikte anaplasmosisli keçilerde bakır ve demir miktarlarının önemli oranda arttığı, magnezyum, potasyum, çinko, sodyum, mangan ve kalsiyum seviyelerinin ise azaldığı ( $P < 0.05$ ) tespit edildi. Anaplasmosisli keçilerde oksidatif stres parametreleri ile element seviyeleri önemli oranda değişiklik gösterdi. Bu bulgu hastalığın ayrıca tanı, prognoz ve tedavisinin değerlendirilmesinde yararlı olabilir.

**Anahtar kelimeler:** Anaplasmosis, Element, Keçi, Oksidatif stres.

## GİRİŞ

Anaplasmosis sığır, koyun, keçi ve yabani ruminantların eritrositlerinde yıkıma neden olan, kene ve kan emici artropodlarla bulaşan enfeksiyöz bir hastalıdır. Anaplasmosise neden olduğu bilinen altı Anaplazma türü vardır: *A. ovis*, *A. marginale*, *A. centrale*, *A. platys*, *A. bovis* ve *A. fagocytophilum*. Bunlardan *Anaplasma ovis* ve *Anaplasma phagocytophilum* koyun ve keçilerde anaplasmosisine neden olan önemli etkenlerdir. Bunlardan *A. ovis* koyun başta olmak üzere koyun ve keçilerde daha fazla anaplasmosise neden olur (Shabana ve ark. 2018).

Anaplasmosiste, anaplasma etkenleri eritrositleri istila ederek hemolize yol açar ve bunun sonucunda anemi meydana gelir. Son zamanlarda yapılan araştırmalarda, Anaplasma türlerinin neden olduğu enfeksiyonda oksidatif stresin, eritrositlerin hasarında ve aneminin oluşmasında etkili olduğu bildirilmiştir (De ve ark. 2012; Jalali ve ark. 2016).

Reaktif oksijen radikalleri (ROS) değişik birçok reaksiyonla hücre ve dokularda oluşur. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önleyen enzimatik olan (süperoksit dismutaz, katalaz v.b.) ve olmayan (glutatyon, vitamin v.b.) antioksidan savunma sistemleri vardır (Değer ve ark. 2009; Esmailnejad ve ark. 2012). Hücre ve dokuların yapısal bütünlüğünün korunmasında ve normal fonksiyonlarını yerine getirmelerinde ROS' un ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin korunması gerekir. Bu dengenin bozulması organizmada oksidatif strese neden olur. Oksidatif strese bağlı oluşan serbest radikaller ise proteinler, lipitler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi vücudumuzun temel yapı unsurlarının hasar görmesine neden olur (Değer ve ark. 2009).

ROS'un etkisi sonucu membranyapısında bulunan poliansatüre yağ asidi zincirinden bir hidrojen atomu uzaklaştırılması ile lipit peroksidasyonu başlar. Lipit peroksidasyonu çok zararlı bir zincir reaksiyondur ve direk olarak membran yapısına, indirek olarak ise reaktif aldehitler üreterek diğer hücre bileşenlerine zarar verir. Eritrosit membranı çoklu doymamış yağ asitleri bakımından zengin ve sürekli yüksek oksijen konsantrasyonuna maruz kaldığı için lipit peroksidasyonuna çok duyarlıdır (Jalali ve ark. 2016). Babesia ve theileria gibi piroplazmalarla enfekte olan hayvanların eritrositlerinde lipit

peroksidasyonuna neden olan serbest radikallerin miktarı artar ve bu artışa bağlı olarak hücre hasarı meydana gelir (Değer ve ark. 2009; Esmailnejad ve ark. 2012; Jalali ve ark. 2016).

Mineraller kemik ve kıkırdak oluşumu, enzimatik reaksiyonlar, hücre içi ve hücre dışı sıvı dengeleri, oksijen taşınımı, elektron transfer reaksiyonları, kas-sinir fonksiyonları ve hormon üretimi gibi fizyolojik fonksiyonlarda görev alırlar. Fazla veya eksikliğe bağlı olarak gelişen mineral dengesizlikleri bazı patolojik durumların gelişmesinde rol oynar (Mert ve ark. 2008). Paraziter hastalıklar, hayvanları iz element ve vitamin noksanlığına duyarlı hale getirir (Dede ve ark. 2008; Akış ve Dede 2009). Paraziter hastalıklarda görülen mineral noksanlıkları, genelde kompleks bir mekanizma gösterir. Bakır, çinko, magnezyum ve mangan serbest radikallerin yol açtığı hasarlara karşı koyan antioksidan sistemler için gerekli iz elementlerdir. Bu elementlerin enfekte olmuş hayvanlarda azalması, oksidatif stresin oluşması için koşullar sağlayabilir. Bu elementlerin konakçı immün fonksiyonu üzerindeki etkisi paraziter enfeksiyonun şiddeti, süresi ve ciddiyetine bağlıdır (Esmailnejad ve ark. 2016).

Bu çalışma, anaplasmosisli keçilerde, bazı oksidatif stres parametreleri (MDA, GSH, CAT) ile makro ve mikro element düzeylerini tespit etmek için yapıldı.

## MATERYAL VE METOT

Bu çalışmanın materyalini Van Büyükşehir Belediyesi Mezbahanesine getirilen ortalama 1.5-2 yaşlarında klinik ve laboratuvar bulgularıyla teşhis konulmuş 35 adet anaplasmosisli ve 10 adet sağlıklı erkek Kıl keçisi oluşturdu.

Her keçinin kulak ucundan alınan kan örneğinden sürme ince kan frotisi hazırlandı, daha sonra bu frotiler Giemsa yöntemiyle boyanarak x100 büyütmede ışık mikroskopunda piroplasmik formlar yönünden incelendi. Ayrıca hayvanların vena jugularisinden antikoagülsiz tüplere kan alındı. Bu kanlar 2000 rpm'de 10 dk santrifuj edilerek serumları ayrıldı. Elde edilen bu serumlarda ticari c-ELISA kiti (Anaplasma antibody test kit, c-ELISA, no: 282- 2VMRD-USA) kullanılarak anaplasma antikorlarının tespiti yapıldı.

Anaplasmosis teşhisi konulan keçilerin serumunda; MDA

düzeyi, Placer ve ark. (1966)'nın metoduna göre yapıldı. Bu amaçla tiyobarbiturik asitle reaksiyona giren MDA'nın konsantrasyonu spektrofotometrede 532 nm'de ölçüldü. MDA ölçümünde standart olarak 1,1,3,3- tetramethoxypropane kullanıldı. GSH düzeyi, Sedlak ve Lindsay'ın bildirdiği metoda göre yapıldı. Bu amaçla 5,5'dithio-bis-2-nitrobenzoic acid kullanılarak oluşan renk değişimi spektrofotometrede 412 nm'de ölçüldü (Sedlak ve Lindsay 1968). Katalaz aktivitesi ise Goth (1991)'un metoduna göre ölçüldü. Bu amaçla amonyum molibdat ve hidrojen peroksidin oluşturduğu renkli kompleksin absorbansı 405 nm'de ölçüldü.

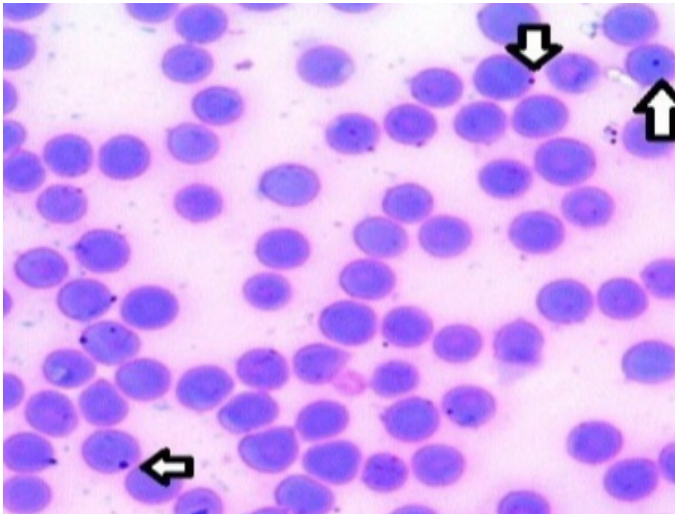
Serumda element (bakır, çinko, manganez, demir, magnezyum, potasyum, sodyum ve kalsiyum) analizi atomik absorpsiyon spektrometresinde (AAS, Thermo Scientific, Model: ICE-3000 series) yapıldı (Morton ve Roberts 1993).

### İstatistiksel analiz

Elde edilen verilerin, istatistik hesaplamaları SPSS 22 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklar Mann-Whitney "U" test kullanılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar  $X \pm SE$  olarak verildi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## BULGULAR

Enfekte keçilerin kulak ucundan alınan kandan yapılan sürme ince kan frotisinin mikroskopik muayenesi ile eritrositler içerisinde mavi-mor renge boyanmış Anaplasma türleri görüldü.



**Şekil 1.** Kan Frotilerinde Anaplasma Türlerinin Eritrosit İçindeki Görünümü (oklar). Giemsa Boyama X 100.

Sağlıklı gruba göre, enfekte keçilerinde, oksidatif stres belirteci olan MDA seviyesinin önemli oranda arttığı, GSH seviyesi ile CAT enzim aktivitesi ise azaldığı görüldü ( $P < 0.05$ ). Bununla birlikte anaplasmosisli keçilerde bakır ve demir miktarlarının önemli oranda arttığı, mangan, magnezyum, potasyum, çinko, sodyum ve kalsiyum seviyelerinin ise azaldığı tespit edildi ( $P < 0.05$ ).

**Tablo 1.** Sağlıklı ve Anaplasmosisli Kıl Keçilerinde Serum MDA ve GSH Miktarı ile CAT Enzim Aktivitesi.

Parametre	Sağlıklı grup (n=10)	Enfekte grup (n=35)	p
MDA (nmol/ml)	( $X \pm SE$ )	( $X \pm SE$ )	0.01
GSH(nmol/mL)	7.84±0.94	10.28±0.78	0.01
CAT (U/L)	2.06±0.06	1.74±0.06	0.01

$P < 0.05$ , aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemli farkları gösterir.

**Tablo 2.** Sağlıklı ve Anaplasmosisli Kıl Keçilerinde Serum Mikro Element Düzeyleri.

Parametre	Sağlıklı grup (n=10)	Enfekte grup (n=35)	p
Bakır (mg/L)	6.9±0.3	9.9±0.6	0.01
Çinko (µmol/L)	1.64±0.01	1.62±0.01	0.07
Manganez (µmol/L)	0.51±0.20	0.41±0.26	0.44
Demir (µg/dL)	85.85±28.55	253.82±56.24	0.01

$P < 0.05$ , aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemli farkları gösterir.

**Tablo 3.** Sağlıklı ve Anaplasmosisli Kıl Keçilerinde Serum Makro Element Düzeyleri.

Parametre	Sağlıklı grup (n=10)	Enfekte grup (n=35)	p
Magnezyum (mg/dl)	3.24±0.18	2.60±0.19	0.01
Potasyum (mmol/l)	12.65±0.36	11.45±0.29	0.01
Sodyum (mmol/L)	133.0±1.7	129.8±1.6	0.03
Kalsiyum (mmol/L)	1.89±0.01	1.78±0.06	0.01

$P < 0.05$ , aynı satırda bulunan parametreler arasındaki önemli farkları gösterir.

## TARTIŞMA

Parazitler yerleştikleri doku, organ ve hücrelerde serbest radikal miktarını artırarak lipit peroksidasyonuna neden olarak, konakçıda doku ve hücre hasarını oluştururlar. Piroplazmosisli hayvanlarda eritrositlerde lipit peroksidasyonu artması ve antioksidan savunmanın azalması eritrosit membran kırılabilirliğini artırır (Chiou ve ark. 2012).

Sunulan çalışmada, serum MDA konsantrasyonu anaplasmosis ile enfekte grupta kontrol grubuna göre önemli ölçüde yüksek bulundu (Ergönül ve Kontaş Aşkar 2009; De ve ark. 2012; El-Ashker ve ark. 2015). Bu sonuca bakılarak anaplasmosisin oksidatif strese ve lipit peroksidasyonuna neden olduğu söylenebilir. Çünkü Anaplasma etkenleri eritrositlerde çoğalır. Bu çoğalma sonucunda eritrositler hasar görür ve parçalanır. Bu sonuçtan farklı olarak Jalali ve ark., (2016) MDA seviyesinin değişmediğini bulmuşlardır.

Antioksidan sistemler, parazitik invazyonların bir sonucu olarak gelişen oksidatif stresten hücre, doku ve organların hasar görmesine karşı koruyucu bir etkiye sahiptir (Deger ve ark. 2009). SOD, CAT, GPx ve GSH eritrositleri lipit peroksidasyonunun yıkıcı etkilerinden korumada en önemli antioksidan maddelerdir (Chaudhuri ve ark. 2008; Cronagaj ve ark. 2017). Eritrositlerde oluşan süperoksit anyonları, süperoksit dismutaz (SOD) ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) dönüştürülür. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> daha sonra glutation peroksidaz (GSH-Px) varlığında GSH ile reaksiyona sokularak veya CAT ile H<sub>2</sub>O ve O<sub>2</sub>'ye dönüştürülerek H<sub>2</sub>O'ya dönüştürülür. Antioksidan etkinin azalması eritrositlerde ROS birikimine yol açar ve oksidatif hasara neden olur (Chiou ve ark. 2012).

Bu çalışmada, GSH seviyesinin ve CAT enzim aktivitesinin azaldığı tespit edildi. Bu azalma eritrositleri ROS kaynaklı oksidatif hasardan korumak için kullanılmalarından kaynaklanmış olabilir. Bu sonuç eritrositik parazitler ile enfekte farklı konakçılarda oksidatif stresin artması ile birlikte GSH seviyesinin (Biçek ve ark. 2005; Rezai ve ark. 2006; Değer ve ark. 2009) ve CAT enzim aktivitesinin (Razavi ve ark. 2011; Esmailnejad ve ark. 2012; Cronagaj ve ark. 2017) azaldığını tespit eden çalışmalar ile uyumludur. Bununla birlikte Chaudhuri ve ark. (2008) *B.gibsoni* enfekte köpeklerde CAT enzim aktivitesinin arttığını bulmuşlardır.

Paraziter enfeksiyonlarda görülen iz mineral eksiklikleri, genelde kompleks bir mekanizmanın sonucu meydana gelir. Bakır, çinko ve mangan antioksidan sistemde görev alan enzimlerde kofaktör olarak görev yapan minerallerdir. Bu minerallerin enfekte olmuş hayvanlarda azalması, oksidatif stresin oluşması için ortam sağlayabilir. Bunların konakçı immün fonksiyonu üzerindeki etkisi paraziter enfeksiyonun şiddeti, süresi ve ciddiyetine bağlıdır (Esmailnejad ve ark. 2012).

Pek çok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda; Kozat ve ark. (2003) *Babesia ovis* ile enfekte koyunlarda bakır seviyesinin arttığını, çinko seviyesinde anlamlı değişiklik olmadığını, Dede ve ark. (2008) *Theileria equi* ile enfekte atlarda, Akış ve Dede, (2009) *Babesia ovis* ile enfekte koyunlarda bakır seviyesinin arttığını, çinko seviyesinin azaldığını, Esmailnejad ve ark. (2012) *Babesia ovis* ile enfekte koyunlarda bakır ve demir seviyesinin arttığını, çinko ve mangan seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Yukarıdaki bildirimlerden farklı olarak Değer ve ark. (2005), theileriosisli sığırlarda bakır ve demir düzeyinin anlamlı oranda düştüğünü bildirmişlerdir. Jalali ve ark. (2016) ise yaptıkları çalışmada, *Anaplasma ovis* ile enfekte keçilerde bakır ve çinko düzeylerindeki azalmanın ve demir seviyesindeki artışın anlamlı olmadığını bulmuşlardır. Bu çalışmada, anaplasmosisli keçilerde önem gösterecek şekilde bakır ve demir seviyesinin yüksek, mangan ve çinko seviyesinin düşük olduğu tespit edildi. Enfekte keçilerde paraziter enfeksiyonun akut faz cevabının bir sonucu olarak serum bakır seviyesi artmış olabilir. Çinko ve mangan seviyelerindeki azalma, hormonal değişimlerle veya parazitin kendisi veya konakçı parazit ilişkisinin doğrudan etkisinin bir sonucu olarak bu minerallerin tüketiminin artmasından kaynaklanmış olabilir. Demir organizmada özellikle hemoglobin ve myoglobin gibi hem bileşikleri ile ve hem olmayan transferrin, ferritin ve hemosiderin yapısında proteinlerle kompleks halde bulunur. Vücuttaki demirin büyük bir kısmı eritrosit içinde hemoglobinin yapısında bulunmaktadır. Demir seviyesindeki artış enfeksiyon nedeniyle eritrositlerin intravasküler hemolizi sonucu açığa çıkan demire bağlı olabilir.



Çalışmamızda, enfekte keçilerde önemli derecede magnezyum, potasyum, sodyum ve kalsiyum düzeylerinin düşük bulunması, theileriosisli atlarda (Takeet ve ark. 2009; Zaeemi ve ark. 2016) ve sığırlarda (Khan ve ark. 2011; Col ve Uslu 2007), babesiosisli sığırlarda (Hashem ve ark. 2018) yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumludur. Mineral seviyelerindeki düşmeler, beslenme bozukluğu, diyet emilimlerinin azalması, bağırsak ve böbrek bozukluklarından kaynaklanmış olabilir (Col ve Uslu 2007). Bizim bulgularımızdan farklı olarak, theileriosisli kalsiyum ve fosfor seviyesinin değişmediği (Garba ve ark. 2012; Vidhyalakshmi ve ark. 2018), magnezyum seviyesinin yükseldiği (Koenhemi ve ark. 2019) tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, anaplasmosisli keçilerde oksidatif stres parametreleri ile element seviyeleri önemli oranda değişiklik gösterdi. Bu bulgu hastalığın ayrıca tanı, prognoz ve tedavisinin değerlendirmesinde yararlı olabilir.

#### KAYNAKLAR

- Akış ME, Dede S. (2009). Babesiosisli koyunlarda çinko ve bakır konsantrasyonları ve karbonik anhidraz enzim aktivitesinin saptanması. *YYU Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20(2): 33-37.
- Biçek K, Değer Y, Değer S. (2005). Some Biochemical and Haematological Parameters of Sheep Infected with *Babesia* species. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16(1):33-35
- Chaudhuri S, Varshney JP, Patra RC. (2008). Erythrocytic antioxidant defense, lipid peroxidase level and blood iron, zinc and copper concentrations in dogs naturally infected with *Babesia gibsoni*. *Res. Vet. Sci.*, 85: 120-124
- Chiou SP, Yokoyama N, Igarashi I, Kitoh K, Takashima Y. (2012). Serum of *Babesia rodhaini* infected mice down regulates catalase activity of healthy erythrocytes. *Exp. Parasitol.* 132: 327-333.
- Col R, Uslu U. (2007). Changes in selected serum components in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 51: 15-18.
- Crnogaj M, Cerón JJ, Šmit I, Kiš I, Gotić J, Brkljačić M, Matijatko V, Rubio CP, Kučer N, Mrljak V. (2017). Relation of antioxidant status at admission and disease severity and outcome in dogs naturally infected with *Babesia canis canis*. *BMC Vet Res*, 13:114.
- De U, Dey S, Banerjee P and Sahoo M. (2012). Correlations among *Anaplasma marginale* parasitemia and markers of oxidative stress in crossbred calves. *Tropical Animal Health and Production*, 44: 385-388.
- Dede S, Deger Y, Deger S, Tanrıtanır P. (2008). Plasma levels of zinc, copper, copper/zinc ratio, and activity of carbonic anhydrase in equine piroplasmiasis. *Biol Trace Elem Res*, 125: 41-45.
- Deger S, Deger Y, Bicek K, Ozdal N, and Gul A. (2009). Status of lipid peroxidation, antioxidants, and oxidation products of nitric oxide in equine babesiosis: status of antioxidant and oxidant in equine babesiosis. *Journal of Equine Veterinary Science*, 29(10): 743-747
- Değer S, Biçek K, Değer Y. (2005). Theileriosisli sığırlarda bazı biyokimyasal parametrelerdeki (Demir, Bakır, Vit C, Vit E) değişiklikler. *YYÜ Vet Fak Derg*, 16: 49-50.
- El-Ashker M, Hotzel H, Gwida M, El-Beskawy M, Silaghi C, Tomaso H. (2015). Molecular biological identification of *Babesia*, *Theileria*, and *Anaplasma* species in cattle in Egypt using PCR assays, gene sequence analysis and a novel DNA microarray. *Vet Parasitol*, 30(3-4):329-34.
- Ergönül S, Konaş Aşkar T. (2009). Anaplasmosis'li sığırlarda ısı şok protein (HSP), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve interleukin (IL-6, IL-10) düzeylerinin araştırılması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15(4): 575-79.
- Esmailnejad B, Tavassoli M, Asri-Rezaei S, Dalir Naghadeh B. (2012). Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *Vet Parasitol*, 185: 124-130.
- Garba UM, Sackey AKB, Agbede RIS, Tekdek LB and Bisalla M. (2012). Plasma total protein, serum calcium and inorganic phosphate levels in Nigerian horses with natural piroplasmiasis. *J. Phys. Pharm. Adv.*, 2: 117-121.
- Goth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*; 196: 143-152.
- Hashem MA, Neamat-Allah ANF, Gheith MA. (2018). A study on bovine babesiosis and treatment with reference to hematobiochemical and molecular diagnosis. *Slov Vet Res*, 55: 165-73
- Jalali SM, Bahrami S, Rasooli A, Hasanvand S. (2016).

- Evaluation of oxidant/antioxidant status, trace mineral levels, and erythrocyte osmotic fragility in goats naturally infected with *Anaplasma ovis*. *Trop Anim Health Prod*, 48:1175–1181.
- Khan IA, Khan A, Hussain A, Riaz A, Aziz A. (2011). Hemato-biochemical alterations in cross bred cattle affected with bovine Theileriosis in semi arid zone. *Pakistan. Vet. J.*, 31: 137-140.
- Koenhemi L, Ateş Alkan F, Morganti G, Barutçu BÜ, Or EM. (2019). Evaluation of trace elements in equine piroplasmosis. *Medycyna weterynaryjna*, 75(02):6230.
- Kozat S, Yüksek N, Altuğ N, Ağaoğlu ZT, Erçin F. (2003). Studies on the effect of iron preparations in addition to babesiosis treatment on the haematological and some mineral levels in sheep naturally infected with *Babesia ovis*. *YYÜ Vet Fak Derg*, 14(2): 18-21.
- Mert H, Mert N, Dogan I, Cellat M, Yasar S. (2008). Element status in different breeds of dogs. *Biol Trace Elem Res.*, 125(2):154-9.
- Morton S, Robert DJ. (1993). Unicam AAS Methods, Manual Issue 2 (05/93) Universty of Bristol, UK Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation(malonyl dialdehyde)in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16: 359–364.
- Razavi SM, Nazifi S, Bateni M. (2011). Rakhshandehroo E. Alterations of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation and serum trace elements associated with anemia in bovine tropical theileriosis. *Veterinary parasitoloji*, 180 (3-4): 209-214.
- Rezai, SA and Dalir-Naghadeh B. (2006). Evaluation of antioxidant status and oxidative stress in cattle naturally infected with *Theileria annulata*. *Vet Parasitol.*, 142: 179-186.
- Sedlak J, Lindsay R.H. 1968, Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent, *Anal Biochem*, 25:192-205
- Shabana II, Alhadlag NM, Zaraket H. (2018). Diagnostic tools of caprine and ovine anaplasmosis: a direct comparative study. *BMC Veterinary Research*, 14:165.
- Takeet M, Adeleye A, Adebayo O and Akande F. (2009). Haematology and serum biochemical alteration in stress induced equine theileriosis. A case report. *Science World Journal*, 4(2): 19-21.
- Vidhyalakshmi TM, Raval SK, Parikh PV, Patel PV. (2018). Biochemical alterations in Horses Infected with *Theileria equi*. *The Indian Journal of Veterinary Sciences & Biotechnology*, 14(2): 30-33.
- Zaemi M, Razmi GR, Mohammadi GR, Abedi V, Yaghfoori S. (2016). Evaluation of serum biochemical profile in Turkoman horses and donkeys infected with *Theileria equi*. *Rev Méd Vét*, 167(11-12): 301-309.

## Symmetric Dimethylarginine (SDMA): A Novel Kidney Biomarker

Neslihan TAŞCENE<sup>1</sup>, Yeliz KAYA<sup>2</sup>, Tevhide SEL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Foot and Mouth Disease Institute, Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Ankara, TURKEY

<sup>2</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, TURKEY

### ABSTRACT

Chronic Kidney Disease is an important disease mainly in elderly and some breed cats. The duration of clinical findings in renal failure is not sufficient for early diagnosis. The kidney is an organ that can stabilize itself and continue to function until it loses 75% of its function. Unfortunately emergence of clinical findings is only possible at this time and this is the most important factor that makes treatment difficult. Creatinine has an more important place in the diagnosis of renal failure than urea but rise in blood occurs when 75% of kidney function is lost. Therefore, creatinine is not an adjunct parameter in early diagnosis. There is a new biomarker that has just begun to be discovered and is included in the studies for early diagnosis: Symmetric Dimethylarginine (SDMA). SDMA and kidney function are highly correlated. SDMA is a methylated arginine amino acid. SDMA is excreted by the kidneys. In this study, blood results of cats diagnosed with chronic renal failure were compared. Also, SDMA and creatinine were compared in some patients and their effects on diagnosis were considered. SDMA, creatinine and BUN values were measured in a blood sample taken from a 10 year old hybrid female cat. SDMA value (15 µg / dL) was high, creatinine (2.2 mg / dL) and BUN (23 mg / dL) values were within normal ranges. This shows us that kidney function is still working, and renal insufficiency is at an early stage. According to the results, the increase in creatinine is correlated with SDMA. As SDMA increases, the loss of renal function increases as a percentage and leads to an increase in creatinine over time. More detailed information can be gathered on the role of SDMA and creatinine in early diagnosis and its relationship with kidney.

**Key words:** Chronic Renal Failure, Creatinine, SDMA.

## Simetrik Dimetilarjinin (SDMA): Yeni Bir Böbrek Biyobelirteci

### ÖZET

KBY başlıca yaşlı ve bazı ırk kediler olmak üzere tüm hayvanlarda önemli bir hastalıktır. Böbrek yetersizliğinde klinik bulguların ortaya çıkış süresi erken tanı için yeterli değildir. Böbrek kendini dengeleyebilen ve işlevinin %75'ini kaybedene kadar görevini yerine getirmeye devam edebilen bir organ olduğu için klinik bulguların ortaya çıkması da ancak bu zamanda mümkündür. Maalesef bu durum tedaviyi zorlaştıran en önemli etkidir. Kreatinin Böbrek yetmezliği tanısında üreden bile daha önemli bir yere sahiptir; fakat kanda yükselmesi ancak böbrek fonksiyonunun %75'inin kaybolmasında ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla Kreatinin erken tanıda yardımcı bir parametre değildir. Yeni yeni keşfedilmeye başlanan ve çalışmalarda erken tanı için yer verilen yeni bir biyobelirteç mevcuttur: Simetrik Dimetilarjinin (SDMA). SDMA ve böbrek fonksiyonu yüksek korelasyon içindedir. SDMA bir metillenmiş arginin amino asididir. SDMA böbrekler tarafından atılır. Bu çalışmada kronik böbrek yetmezliği tanısı konmuş kedilere ait kan sonuçları karşılaştırılmıştır ve bazı hastalarda SDMA ile kreatinin karşılaştırılarak tanıdaki etkileri göz önünde bulundurulmuştur. 10 yaşında melez dişi bir kediden alınan kan örneğinde SDMA, kreatinin ve BUN değerlerine bakılmıştır. SDMA değeri 15 µg/dL yani yüksek kreatinin (2.2 mg/dL) ve BUN (23 mg/dL) değerleri ise normal aralıklarda çıkmıştır. Bu bize Böbrek fonksiyonlarının çalıştığını ancak böbrek yetersizliğinin başlangıç aşamasında olduğunu göstermektedir. Burdan çıkarılabilecek sonuca göre SDMA ile Kreatinin artışı korelasyon içindedir ve SDMA yükseldikçe böbrek fonksiyonundaki kayıplar yüzde olarak artmaktadır ve zamanla Kreatininde yükselmesine neden olmaktadır. Daha ayrıntılı çalışmalar yaparak SDMA ile Kreatininin erken tanıdaki rolü ve böbrekle ilişkisi hakkında bilgi toplanabilir.

**Anahtar kelimeler:** Kreatinin, Kronik Böbrek Yetmezliği, SDMA.

## INTRODUCTION

Chronic renal failure is an irreversible and progressive disease (Adalati et al. 2003). It is a disease caused by decreased glomerular filtration rate. When the glomerular filtration rate decreases to 35-50 ml/min, clinical symptoms begin to appear. Uremic syndrome begins when GFR decreases below 20-25 ml / min and end stage renal disease occurs when GFR decreases to 5-10 ml / min (Tanriverdi et al. 2010). The clinical manifestation of Chronic Renal Failure can be confused with other diseases. General symptoms include polyuria, polydipsia, vomiting, lethargy, weight loss, and loss of appetite (Relford et al. 2016). Important parameters in Chronic Kidney Diseases are: Urea, Creatinine, BUN (Blood urea nitrogen), Total Protein, Phosphorus, Calcium and SDMA (Symmetric Dimethylarginine) (Smeltzer and Bare 2000).

Creatinine is an important kidney parameter related to GFR. However, it is not 100% reliable in renal function because it is affected by both protein intake and muscle mass (Braun et al. 2008). Creatinine level decreases with age. SDMA level increases only due to GFR reduction. For example, there is a 50% decrease in GFR versus an increase in serum creatinine level from 0.7 to 1.4 mg/dl. In a study with cats blood results for SDMA was found increased, 8 months earlier than creatinine (Grauer et al. 2016). Creatinine begins to increase only when 75% of renal function disappears, whereas SDMA increases only in 20% loss of function (Relford et al. 2016; Nabity et al. 2015).

SDMA is a methylated arginine amino acid. SDMA is derived from intranuclear methylation of L-arginine residues and released into the cytoplasm after proteolysis. SDMA is excreted by the kidneys. Methylation of arginine residues is catalyzed by an enzyme group called protein arginine N-methyl transferases (Kielstein et al. 2006). SDMA has a small molecular size like 202 g/mol and because of its small size SDMA is a good kidney biomarker because it has a positive charge and be filtered by glomerular filtration. SDMA has an extensive renal clearance and that is a point too, to be a good kidney biomarker (Kielstein et al. 2006; Glorieux et al. 2016).

## MATERIALS AND METHODS

In this study, blood results from cats diagnosed with kidney disease were compared and creatinine and SDMA values were determined. Blood results were obtained from a veterinary clinic in Ankara. Blood samples from 8 cats are available. In 3 of these, both SDMA and Creatinine levels could be compared. Serum SDMA levels were not evaluated in the remaining 5 cats. 6 parameters were measured in blood serum samples. These are: Creatinine, BUN, Total Protein, phosphorus, calcium and SDMA. Parameters were measured in autoanalysers. Blood was taken from some patients twice: before and after treatment.

## RESULTS

**Patient 1:** The first visit to the clinic was on June the 13, 2019. The cat had a weight loss and The cat was brought to the clinic with complaints of appetite and weight loss. After the blood analyse the cat was diagnosed with CKD. At the first blood analyses Creatinine levels: 4,4 mg/dL (H), Total Protein levels: 9,5 g/dl (H), BUN levels: 53,6 mg/dl (H) were high and Phosphorus levels: 3,4 mg/dl (N) was normal. After clinical treatment on July the 29 the blood was checked for a second time and Creatinine levels decrease to 2,8 mg/dl, BUN levels decrease to 38 mg/dl and phosphorus levels increase to 4,7 mg/dl. The increase in phosphorus levels may be due to food intake due to increased appetite.

**Patient 2:** In April a cat came to the clinic with serious weight loss and anorexia. After Blood analysis it was diagnosed with CKD and clinical treatment began. Creatinine levels: 3,6 mg/dl, BUN: 64,8 mg/dl and Phosphorus: >15 mg/dl were too high and unfortunately this old cat passed away after 3 days.

**Patient 3:** This case was slightly different because in this case the cat was a young British shorthair and the blood results at first analysis were too high but only after 2 days at the second check blood results gone better. Creatinine levels decreased from 20,7 mg/dl to 15,1 mg/dl and BUN levels were higher than 140 mg/dl and it could not be measured. The first check was on August 29, 2019 and second check was on August the 31.

**Patient 4:** A 14 years old Persian cat with 2 weeks anorexia came to the clinic and the first blood results on May the 6, 2019 are; Creatinine 3,1 mg/dl (H) and BUN 41,1 mg/dl (H). After

treatment on May the 27 Creatinine levels decreased to 2,4 mg/dl and BUN levels decreased to 26,8 mg/dl.

**Patient 5:** A 10 years old cat with anorexia and vomiting came to the clinic on September 29 and blood serum was taken to check. Creatinine levels: 3,4 mg/dl (H), BUN levels: 119 mg/dl (H), Total Protein levels: 4,9 g/dl (L) and Phosphorus levels: 8,6 mg/dl (H). Based on these values, chronic kidney disease was diagnosed. Unfortunately we lost this patient during the treatment process.

**Patient 6:** This case is an important case because in this case we can see the difference in early diagnosis between SDMA and Creatinine. This patient is a 10 years old mixed female cat. The blood results on February the 27 are; Creatinine (2,2 mg/dl), BUN (23 mg/dl), Total Protein (7,9 g/dl), Phosphorus (4,3 mg/dl) and Calcium (10,3 mg/dl) are in normal ranges only SDMA levels are high (15 µg/dl). The normal ranges for SDMA are 0 to 14 µg/dl. This is a new increase in SDMA, so we can say that this is an early diagnosis. If we make an estimate for better understanding, it is likely that in this case the kidneys have lost only a small part of its function and are now at the stage of recovery.

**Patient 7:** A 10 years old sterile female munchkin cat visit the clinic for the first time on July the 19, 2019. At the first blood results Creatinine levels were too high to measure. SDMA levels were 83 µg/dl, BUN levels were higher than 130 mg/dl Total Protein (9,6 mg/dl) and Phosphorus levels (higher than 16,1 mg/dl) were too high too. Only Calcium levels were in normal ranges (9,6 mg/dl). Here in this case we can see that this is not an early diagnosis because of the values in Creatinine and BUN.

**Patient 8:** This is a different case because of the cat. This cat has come to the clinic with a very bad general situation. The first blood check was on July the 8, 2019 and Creatinine (3,6 mg/dl) and SDMA (19 µg/dl) levels were high but not so high like in patient 7. And the other values like BUN (29 mg/dl), Phosphorus (5,1 mg/dl), Total Protein (8,8 g/dl) and Calcium (10,7 mg/dl) were in normal ranges. When there was no improvement in the general condition 2 months after treatment, a blood sample was taken again to compare the values. This time the values were higher than the previous sample. SDMA: too high to measure, Creatinine: 4,4 mg/dl (H),

BUN: 42 mg/dl (H), Total Protein: 8,4 g/dl (N), Phosphorus: 5,1 mg/dl (N) and Calcium: 10,5 mg/dl (N). This cat passed away.

SDMA is an early diagnosis biomarker which is important for CKD. In this case we can see the importance of early diagnosis. Increase in SDMA will occur much earlier than creatinine, so by checking SDMA during blood analysis is vital for early diagnosis of kidney dysfunction. To be sure we have to check out SDMA. Early diagnosis saves lives.

## REFERENCES

- Adalati R, Soyogul Gurer Ü, Cevikbas A, Johansson C. (2003). Investigation of the In Vitro Effect of Cefodizime on Polymorphonuclear Leucocyte Functions in Chronic Renal Failure Patients. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33:85-91.
- Braun JP, Lefebvre HP, Watson ADJ. (2008). Creatinine in the Dog: A Review. *Vet Clin Pathology*, 32(4):162-179.
- Glorieux G, Neiryck N, Pletnick A, et al. (2016). Uraemic toxins: overview. In: Turner N, Lamiere N, Goldsmith DJ, et al, editors. *Oxford textbook of clinical nephrology*. 4th edition. Oxford (United Kingdom): Oxford University Press, p. 2161-73.
- Grauer G. (2016). Early diagnosis of chronic kidney disease in dogs & cats: use of serum creatinine & symmetric dimethylarginine. *Today's Vet Pract*, 6:68-72.
- Kielstein JT, Salpeter SR, Bode-Boeger SM, Cooke JP, Fliser D. (2006). Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function—a meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*; 21: 2446-2451.
- Nabity MB, Lees GE, Boggess MM, Yerramilli M, Obare E, Rakitin A, Aguiar J, Relford R. (2015). Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med*, 29:1036-44.
- Relford R, Robertson J, Clements C. (2016). Symmetric Dimethylarginine: Improving the Diagnosis and Staging of Chronic Kidney Disease in Small Animals. *Vet Clin Small Anim*, 46 941-960.
- Smeltzer SC, Bare B. (2000). *Medical-Surgical Nursing*. 9. Baskı, Lippincott, pp.1952-1972.
- Tanriverdi MH, Karadag A, Hatipoglu ES. (2010). Chronic Kidney Failure. *Konuralp Tip Dergisi*, 2(2):27-32.

## Ozone Application and Usage in Veterinary Medicine

Derya ÜNAL, Tevhide SEL

Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, TURKEY

### ABSTRACT

In general, it has a protective effect against the harmful effects of UV rays in the living organism. After the discovery of ozone in different patients (hepatic steatosis, chronic ulcer, orthopedic diseases, cancer, immunodeficiency, infected wounds, fistula, burn, mastitis, etc.) was used as a therapeutic agent O<sub>3</sub> suppresses inflammatory cell factors, activates cyclooxygenase and reduces stress reactions to histiocytic oxidations and increases histiocytic ability to resist oxidation and free radicals. It increases the production of antioxidant enzymes while restoring cell homestasis. It shows free radicals due to chronic inflammation, pain relief and antiinflammatory effect. In the immune system, it acts as an ozone modulator. Different application methods such as medical ozone, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, subcutaneous can be applied and can cause local irrigation. The purpose of this review is to evaluate the general properties of ozone, the application of medical ozone and its use in veterinary medicine for treatment.

**Key words:** Medical Ozone, Medical Ozone Application Methods, Ozone, Ozone Treatment.

## Ozon Uygulaması ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı

### ÖZET

Ozon(O<sub>3</sub>), keskin kokuya sahip olan ve ilk kez 1848 yılında keşfedilmiş renksiz bir gazdır. Genel olarak, canlı organizmada UV ışınların zararlı etkilerine karşı koruyucu etki yaratmaktadır. Ozon keşfedildikten sonra farklı hastalarda (hepatik steatoz, kronik ülser, ortopedik hastalıklar, kanser, immün yetmezlik, enfekte yaralar, fistül, yanık, mastitis vb.) terapötik ajan olarak kullanılmıştır. O<sub>3</sub>, enflamatuar hücre faktörlerini baskılamakta, siklooksijenazı aktive etmekte ve histiyositik oksidasyonlara karşı stres reaksiyonlarını azaltmakta, oksidasyon ve serbest radikallere karşı direnç gösteren histiyositik yeteneğini artırmaktadır. Antioksidan enzimlerin üretimini artırırken hücre homestazisini ise restore etmektedir. Kronik enflamasyondan kaynaklı serbest radikalleri temizleyici, ağrı kesici ve antiinflamatuar olarak etki göstermektedir. Immün sistemde ise ozon modülatör olarak görev yapmaktadır. Farklı uygulama yöntemleri olan tıbbi ozon, intraperitoneal, intramüsküler, intraartiküler, subkutan şeklinde uygulanabilmekte ve lokal irrigasyona neden olabilmektedir. Bu derlemede amaç ozonun genel özelliklerini, tıbbi ozonun uygulama şekillerini ve sağaltım açısından veteriner hekimliğinde kullanımını değerlendirmektir.

**Anahtar kelimeler:** Ozon, Ozon Sağaltımı, Tıbbi Ozon, Tıbbi Ozon Uygulama Yöntemleri.

## GİRİŞ

### Ozon Nedir?

Ozon, Yunanca "ozein" sözcüğünden türetilmiş olup "Koklamak" anlamına gelmektedir. İlk olarak 1840 yılında Christian Fricdrich Schönbein tarafından keşfedilmiştir. Dünyayı çevreleyen stratosfer katmanında ki gazlardan en önemlilerinden biri olan ozon, güneşten gelebilecek zararlı ultraviyole ışınlarını absorbe edebilmektedir. Bu sayede yeryüzünde biyolojik olarak dengenin sürekliliğinin sağlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır (Bocci 2006a; Bocci 2006b). Yarılanma ömrü 20°C de 40 dk olan ozon, oksijene göre suda 10 kat daha fazla miktarda çözünür ve 1,6 kat daha yoğundur. Ozon, oksidanlar arasından florin ile persülfat sonrasında gelen en kuvvetli oksidandır. Ticari olarak kullanılan ve doğal tek dezenfektan olan O<sub>3</sub>, gaz halde mavi, sıvı ve katı halde ise mavi/siyah renktedir. Gaz formunda olan O<sub>3</sub>'un, normal basınç ve sıcaklık altındayken oldukça kararsız halde, suda kısmen çözünmekte ve keskin bir kokusu bulunmaktadır (Mahapatra ve ark. 2005).

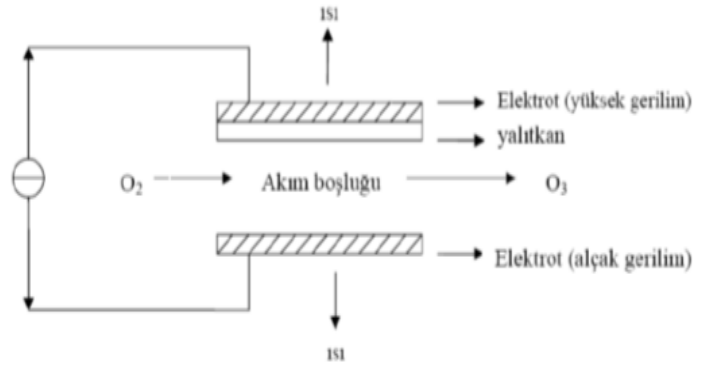
### Ozonun Kullanım Alanları

Ozon, genel olarak gaz ve sıvı formda yüzey alanaları başta olmak üzere birçok alanda kullanılabilir. Su dezenfeksiyonunda, koku, tat, bulanıklık, renk, nitrit ve siyanid ile amonyak uzaklaştırılmasında, tarımsal ilaçların kalıntılarının uzaklaştırılmasında, soğuk hava depolarının dezenfeksiyonunda, veterinerlikte oluşan enfeksiyonların giderilmesinde, aflatoksin arındırma işlemlerinde, hastane, otel, hava alanı gibi klima sistemine sahip alanlarda, havuzlarda, virüsün neden olduğu hastalıkların tedavisinde, bakteri ve virüs dezenfeksiyonunda, zayıflamak amacıyla, cilt hastalıkları tedavisinde, dolaşım bozuklukları, kronik yorgunluk, akne, sedef gibi cilt hastalıklarında, migren gibi nörolojik hastalıklarda, balık üretimi yapılan çiftliklerde, akvaryumlarda, balık, et ve tavuk işleme tesislerinde, endüstriyel atık sularının kontrolü ve dezenfeksiyonunda, atık suların arıtılmasında, tekstil endüstrisinde, üniversitelerle birlikte araştırma kurumlarının yaptığı Ar-Ge çalışmalarında kullanılmaktadır (Çağlaroğlu 2011). Ayrıca gıda endüstrisinde yapılan mikrobiyal yükü azaltıp raf ömrünü uzatmaya yönelik çalışmalarda da ozon uygulaması kullanılmaktadır. Ozon uygulaması ve oksijen tutucu kullanımının modifiye

atmosferde paketlenen tavuk göğüs etlerinde mikrobiyal gelişimi baskıladığı tespit edilmiştir (Ünal 2017).

### Yapay Ozon Üretimi

Yüksek iletkenliğe sahip olan ultraviyole lambanın 185 nm'de yaydığı radyasyon ile havadaki oksijenin reaksiyon vermesi sonucu 0,03 ppm civarında düşük konsantrasyonda ozon üretilmektedir (Kim ve ark. 1999).



**Şekil 1.** Korona Akım Metodu Şeması (Anık 2007)

Korona deşarj yöntemi ile ticari ozon üretilmektedir. Bu yöntem oksijen molekülünün elektrik akımından geçirilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Korona akım yönteminde üretim sırasında yoğun enerji sayesinde meydana gelen kararsız haldeki oksijen atomları diğer O<sub>2</sub> molekülleriyle etkileşime girerek üç oksijen atomuna sahip ozonu oluşturmaktadırlar. Bu yöntem fazla miktarlarda ozon üretimini sağlayabilmektedir. Bununla birlikte diğer O<sub>3</sub> üretim tekniklerine göre daha ekonomik olduğu düşünülmektedir (Anık 2007).

### Ozon Kullanım Dozu ve Sağlık Açısından Önemi

Ozonun kullanım dozu hesaplanırken düşük miktarlarda kullanılan ozonun etkisinin yetersiz kaldığı, yüksek dozların ise toksikasyona neden olduğu bilindiğinden dolayı dikkat edilmelidir. Ozon uygulamasına düşük dozda (10 µg gaz/mL kan) başlanıp konsantrasyonu ise kademeli olarak artırarak devam edildikten sonra herhangi bir kronik ya da akut toksisiteye neden olmadan başarılı sonuçların elde edilmesi sağlanmaktadır (Bocci 2006a; Güzel ve ark. 2011).

Bocci(2006b), ozonun farklı dozlarını (20,40,60,80 µg/ml) kanla

karıştırarak yaptıkları çalışmalarında, verilen doz oranında kanda glutatyon ve toplam antioksidan düzeylerinde azalma, okside glutatyon ile lipid peroksidasyonu seviyelerinde ise artma meydana geldiğini gözlemlemişlerdir. Uygulamanın 20 dk sonrasında antioksidan seviyelerinin tekrar eski seviyelerine geldiğini belirtmişlerdir.

Göz ve akciğer ozona karşı oldukça hassas organlardır. Ozona uzun süre maruz kalınması durumunda epifora, öksürük, üst solunum yolları irritasyonu, bronko konstrüksiyon, rinit, baş ağrısı ve kusma gibi yan etkiler görülebilmektedir. Bu durumda oksijen, askorbik asit, E vitamin ve n-asetilsistein uygulanabilmektedir. Aktif hemoraji, anemi, gebelik ve hipertiroidizm gibi durumlarda ozon uygulanmamalıdır. Solunan havadan yada saf oksijenden elde edilen ozon, kimyasal bir madde olmadığı gibi aktif bir oksijendir. Doğal koşullarda elde edilebilen tek dezenfektan olan O<sub>3</sub>, işletme maliyeti bakımından diğer dezenfektanlardan daha az olup havada ve suda mikroorganizma ve kötü kokuyu yok etmektedir. Ozonun çevre dostu olması, kullanımı sırasında kimyasal maddeye ihtiyaç olmaması bunun yanı sıra kimyasal maddelerden arta kalan atıkları yok etmede etkin olması insektisitlerde etkili olması, uygulama kolaylığı açısından avantajlara sahiptir (Güzel ve ark. 2011).

### **Ozonun Antimikrobiyal Etkisi**

Yapılan araştırmalar sonucunda ozonun iodin ve klorinden daha fazla antimikrobiyal etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ozona birkaç dakikalığına maruz kalan spor, bakteri ve virüslerin aktivitelerini kaybettikleri kanısına varılmıştır (Zobel ve ark. 2014). O<sub>3</sub> bu etkisini, hücre zarı içinde bulunan doymamış yağ asitleri ve sıvı ortamda oluşan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile etkileşimi sonucunda oluşan lipid oksidasyonu ürünleri vasıtasıyla gerçekleştirmesiyle birlikte ayrıca hücre zarından geçen mikroorganizmanın, nükleik asit çekirdeğinden kapsite yayılıp virüse ait nükleik asite zarar vererekte gösterebilmektedir (Djuricic ve ark. 2014). Sharma ve Hudson (2008), ortama verilen 25 ppm dozunda ozon gazı, 20 dk'da kuru yüzeylerdeki, araç ve gereçlerdeki hastane kaynaklı bir çok bakteriye karşı bakterisidal etki gösterdiğini tespit etmişlerdir.

### **Ozonun İmmünstimulan Etkisi**

İmmün ve eritrosit sistem hücrelerinin aktivasyonunu sağlamada önemli rolü olduğu bilinen ozon, eritrosite ait metabolizmayı uyararak servikal mukus miyeloperoksidaz, lizozim etkinliğini ve immünglobulin (Ig) A seviyesini artırmakla beraber IgM ve IgG seviyelerini ise azaltmaktadır. Lokal immün sistemde sağlanan bu denge sayesinde eritrosit metabolizması ve lokal immün sistem etkinliği artmakta ve immün sistem uyarılmaktadır (Jakab ve ark. 1995).

### **Ozonun Antiinflamatuvar Etkisi**

İnhalasyon şeklinde uygulanan ozonun, uygulamanın ardından 3-24 saat içerisinde yangısal reaksiyonun aktif hale gelmesinden sorumlu nötrofiller bölgeye göç etmekte ve fagositik aktivitede artma meydana gelmektedir. Aynı zamanda ozonun doğal öldürücü hücrelerin sayısında azalmayı sağlayarak sitotoksik faaliyetleri ve sitokin sekresyonunu önlediği tespit edilmiştir (Küçüksezer ve ark. 2014). İnsanda inflamasyon mediyatörler ve bakteriyel endotoksinlerin oluşumunda rolü olan şemokin ve sitokin, erken dönem abortuslarda, implantasyon sorunlarında sublinik invitro fertilizasyon ile endometriyal enfeksiyonlarında etkin oldukları tespit edilmiştir. (Romero ve ark. 2004).

### **Ozonun Analjezik Etkisi**

Ozon, allopeptit adıyla bilinen ve albuminolinin ürünlerinden olan maddelerin oksidasyonunda etkilidir. Allopeptitler, hasarlı dokularda sinir duyusunun yoğunluklarına etki etmektedirler (Kim ve ark. 2009).

### **Ozonun Detoksifikasyon Etkisi**

Ozon, karaciğer ve böbreklerdeki metabolik aktiviteleri uyarmakta ve bu organların detoksifikasyon oranlarını artırmaktadır (Kim ve ark. 2009)

### **Ozonun Antioksidan Etkisi**

Güçlü oksidasyon oluşturabilme yeteneğine sahip olan ozon bu sayede fungusid, virüsid ve bakterisid olarak etki gösterebilmektedir. Bu özellikleri sayesinde 260 civarında patolojik vakaların düzeltilmesinde yararlanılmaktadır. Yüksek seviyede oksidatif etkiye sahip olan ozon ile teması sağlanacak tüm malzemelerin teflon, silikon ve cam gibi O<sub>3</sub>'e dayanıklı malzemelerden olması gereklidir (Kim ve ark. 2009)



Ozonun organizmada yarattığı oksidatif etki antioksidan enzim sistemlerinde aktivasyonu sağlamaktadır. Uygulamanın bitiminden hemen sonra O<sub>3</sub> kanda çözünmekte ve çoklu doymamış yağ asitleri, ürik asit, askorbik asit ve albumin gibi antioksidanlarla hızla reaksiyona girebilmekte ve çok hızlı oluşan bu reaksiyonlar sırasında O<sub>3</sub> tamamen nötralize olmakta ve reaktif oksijen radikalleri (ROS), hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ve lipid oksidasyon ürünleri (LOP) meydana gelmektedir. Katalaz (CAT), (süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) oluşan tüm serbest radikallere karşı vücudun savunma mekanizmasında etkili olan antioksidan enzimlerin aktif hale gelmesini hızlandırmaktadır. Aynı zamanda endotelial, kan ve parankimal hücrelerin aktivasyonu sağlanarak organizmanın hastalıklara biyolojik ve törapatik cevap oluşturulması sağlanmaktadır (Bocci 2006a; Bocci 2006b; Bocci 2007).

### Ozonun Hemostatik Etkisi

Ozon, yüksek dozlarda eksternal olarak kullanıldığında aşırı hiperkoagülasyona neden olmakta, düşük dozlarda parenteral olarak kullanıldığında ise fibrinolitik aktivitede artmasını sağlamakta ve trombolitik aktivitenin azalmasına yol açmaktadır (Bocci 2006a).

### Ozonun İmmün Modülatör Etkisi

Bu etkisi ozonun dozuna bağlı olarak değişir. Düşük dozlarda ozon gazı, makrofaj ve monosit zarına etki ederek ozonoit ürünlerin oluşumuna yol açar ve bu ürünlerin oluşmasına cevap olarak bu hücrelerden sitokin salınımı gerçekleşir. Bu salınan sitokinler sonucu non-spesifik savunma sistemini (vücut sıcaklık artışı, akut faz reaktan artışı) aktive eder ve daha sonra humoral savunma sistemi aktive olur. Yüksek konsantrasyonlarda ise yine makrofaj ve monositlerin zarında yoğun lipid peroksidasyonuna yol açar ve bunun sonucunda bu hücrelerden sitokin salınımı durur. Bu hücrelerin aktivitelerinin azalmasına bağlı olarak, onlarla ilişkili T ve B lenfositlerin aktivitelerinde azalma olur. Bu etkisi romatoid artrit, skleroderma, vb sistemik hastalıklarda ilaçsız tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır (Oleg ve ark. 2008).

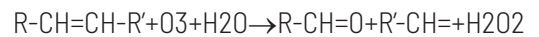
### Tıbbi Ozon Nedir?

Organizmada ozon; Hemoglobinden O<sub>2</sub> nin ayrılmasında, Metabolik detoksifikasyonun oluşmasında önemli bir rolü

bulunan CoA'nın oluşumunu arttırmada, Düşük dozda lökositou ve fagositozu indükleyerek bağışıklık sistemini stimüle etmede, yüksek dozda ise inhibe etmede, Retikülo-endotelial sistemi stimüle ederken doku hasarlarını ise tedavi edici yönde desteklemede, Kuvvetli germisid aktivitesini kullanarak patojen mikroorganizmaların birçoğunun hücre duvarını parçalamada ve Fungusid etkisiyle candida gelişimini inhibe etmede etkilidir (Kutlubay ve ark., 2010).

Tıbbi amaçla kullanılacak olan ozon, teknik ozonun aksine saf tıbbi O<sub>2</sub> kullanılarak hazırlanmakta ve normal atmosferik havanın bu karışıma dahil olmaması gerekmektedir. Eğer ozon, havada ki NO<sub>2</sub> ile reaksiyona girdiği takdirde toksik bir gaz olan N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oluşumuna neden olmaktadır. Ozon molekülü sabit kalamadığı için tıbbi kullanılacaksa her zaman taze ve uygulama öncesi çalışma alanında hazırlanarak anında uygulanmalıdır (Viebahn 1994).

Ozon hastaya saf halde kesinlikle verilmemeli kesinlikle belli dozda oksijen ile karıştırılarak verilmelidir. Karışımdaki oksijenin %95 den düşük ve ozon oranı ise % 5 ten yüksek olmaması gerekmektedir. Bunun yanı sıra emboliye yol açmaması için ozon gaz halinde doğrudan damar içerisine verilmemeli, dışarda kanla iyice karışımı sağlandıktan sonra infüzyon şeklinde uygulanmalıdır Uygulanan ozon dozuna bağlı olarak DNA, RNA, karbonhidratlar ve proteinler (bu sayede enzimler de) bu reaksiyondan etkilenmektedir. Bu bileşiklerin hepsi ozonun karşısında elektron donörüş şeklinde davranarak oksitlenmektedirler. Sonuç olarak hidrojen peroksit, hipoklorik asit ve süperoksit gibi reaktif oksijen türevleri (ROT) oluşmaktadır. Bu reaksiyonlardan en önemli olanı ise doymamış yağ asitlerinin ozon ile oksidasyonudur. Temel reaksiyon aşağıda belirtildiği gibidir (Bocci ve ark. 2011).



Bu reaksiyonun ürün kısmında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve iki adet lipid oksidasyonu ürünü (LOP) meydana gelmektedir. Lipid oksidasyon ürünlerinden en iyi bilinenleri; lipoperoksil radikalleri, malondialdehit, hidroperoksitler, alkenaller izoprostan ve 4-hidroksi-2,3-trans nonenal (HNE)dir (Schaur 2003).

### Tıbbi Ozon Uygulama Yöntemleri ve Oluşturduğu Etkiler

Ozonun etkisi klinik ve kimyasal olarak iki yöntem ile

incelenmektedir. Ozonun gaz hali kuru ortamlarda etki gösteremezken, lenf, su, serum, idrar ve plazmada eriyen molekül, ozon ile reaksiyon verirken biyomolekül oksitlenerek ortama reaktif O<sub>2</sub> vermektedir. O<sub>3</sub> etkisini tercihen ilk olarak çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA-polyunsaturated fatty acids) üzerinde gösterirken daha sonra ürik asit, askorbik asit gibi antioksidanlara, sistein benzeri-SH gruplarını içeren tiyol bileşiklerine, redükte glutatiyona (GSH) ve albümine göstermektedir. Bununla birlikte konsantrasyon miktarları göz önünde bulundurulduğunda O<sub>3</sub>, karbonhidrat, RNA, DNA ve enzimler ile reaksiyon verebilmektedir. Bu reaksiyonlar esnasında biyomoleküller elektron alıcısı şeklinde rol oynamaktadır (Bocci 2006a).

Ozon klinik olarak uygulanması sırasında, hastadan kan alınarak ozonlanmakta aynı hastaya kas içi (İM) veya intravenöz (İV) yolla verilmektedir. Bu iki farklı uygulama yöntemlerinin dışında transdermal, inhalasyon ve rektal üfleme gibi ana başlıkların altında yer alan 30 farklı şekilde uygulama yöntemi bulunmaktadır. Lokal uygulamalarda medikal ozon, doğrudan eklem, kas, tendon, disk, deri içine yada vücut boşluğuna uygulanması esasına dayanmaktadır. Ozon ayrıca sinüzit ve otitis gibi vakalarda da lokal olarak uygulanabilmektedir. Topikal uygulamalarda ise medikal ozon doğrudan cilt yüzeyine uygulanmaktadır (Kutlubay ve ark. 2010).

O<sub>3</sub> gazı, plazmada eriyerek kan hücrelerinin zarında bulunan doymamış yağ asitlerini oksitleyerek reaksiyon vermekte ve bunun sonucunda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> başta olmak üzere birçok reaktif oksijen türleri (ROS) meydana gelmektedir. Plazmada ROS çok hızlı bir şekilde oluşurken antioksidan kapasitesi % 5-25 civarında azalmaktadır. Fakat oluşan bu etkinin geçici olduğu ve 15-20 dk içerisinde toparlanma görülebilmektedir (Mendiratta ve ark. 1998).

Çok kararlı olmayan ROS vücuda alınmadan önce bozulmaya başlamaktadır. Halbuki LOP daha stabil ve kana verildiği andan itibaren seyrelmekte, bununla birlikte idrar ve safra yoluyla bir kısmı dışarı atılmakta geriye kalan kısım aldehid dehidrogenaz (ALDH) ve GSH-transferaz (GSH-Tr) sistemleriyle metabolize olmaktadır. Bunların dışındaki µM konsantrasyondaki bu maddeler ise vücutta devam eden oksidatif stresin habercisi gibi vücutta yayılmaktadır. Bu sayede vücutta superoksit dismutaz (SOD), GSH-peroksidaz (GSH-Px), GSH-redüktaz

(GSH-Rd) ve katalaz (CAT) gibi antioksidan enzimlerinin üretimi artarken, LOP ise oksidatif stres proteinleri üzerinde indükleyici etki yaratmaktadır (Snyder 2001).

Organizmanın ozon muamelesine maruz kalması sonucunda vücutta 12 farklı etkinin olduğu gözlemlenmiştir. Bunlardan en önemlileri; hücrenin metabolik faaliyetlerinin aktif hale gelmesi, uyarılan eritrosit metabolizması sayesinde hemoglobinin oksijeni taşıma kapasitesi ve bu sayede dokularda oksijen konsantrasyonunun artırılması, immün sisteminde güçlenme ve serbest radikal düzeylerinin düşmesi şeklinde sıralanmaktadır (Bocci 2006b)

### Tıbbi Ozonun Sistemik Uygulama Biçimleri

#### **Major Otohemoterapi**

Ozonun kan yoluyla uygulanmasına, major otohemoterapi denmektedir. Bu uygulama yönteminde, hastanın vücut ağırlığıyla oranlanan ozon miktarına karşılık dayanıklı antikoagülanlı cam şişe içerisine belli miktarda kan (100-200ml) örneği alınmaktadır. Alınan kan örneği, eşit hacimlerde her mililitrede 10-80mg/ml doz ozon olacak şekilde medikal ozonla karıştırılmaktadır, yaklaşık 15 dk içerisinde ozonlanan kan yeniden aynı hastaya yavaş yavaş geri verilmelidir. (Bocci 2006a; Bocci 2006b; Lu ve ark. 2010). Bu yönteme ait önemli endikasyonlar, enfeksiyonlar, arteriyel dolaşım bozuklukları, kanser hastalarının ek tedavisi, bağışıklık yetersizliğinden kaynaklanan hastalıklar, eklem iltihapları ve romatizmal hastalıklardır (Viebahn 1994).

#### **Minör Otohemoterapi**

Ozon, kas içi yoluyla uygulanması ise minor otohemoterapi olarak adlandırılmaktadır. Bu şekilde uygulama yönteminde hastadan çok az miktarda (3-5 mL) kan alınarak eşit hacimlerde medikal ozon ile karıştırılıp aynı hastaya yeniden kas içine enjeksiyon şeklinde uygulanmaktadır. Laboratuvar araştırma sonuçlarına istinaden, minor veya major otohemoterapiye uygun olamayan hastalarda ozonun, rektal üfleme şeklinde uygulanması uygun bulunmaktadır (Bocci 2006a; Bocci 2006b) Rektal O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> insüflasyonu

Rektal insüflasyon, yeterli miktarda O<sub>3</sub>/O<sub>2</sub> gaz karışımını (O<sub>3</sub> en çok %5, O<sub>2</sub> en az %95) anüsten rektum içerisine verilmesine denmektedir. Bu yöntem sayesinde yangısal bağırsak rahatsızlıklarında patojen mikroorganizmalar ile

bozulan flora düzenlenmekte ve iyileşme hızlanmaktadır (Sunnen, 2005). İşlemin uygulanmasına engel teşkil eden endikasyonlar arasında sistemik MAH'a göre özellikle intravenöz reinfüzyonun damarların uygun olmamasından kaynaklı yaşlı hastalara uygulanamaması, topikal olarak bağırsaklarda proktit ve kolit gibi patloojik vakalar ve çocuklarda bir enfeksiyonun diğerini takip ettiği bağışıklık sisteminde hassasiyet oluşmuş pediatrik vakalar yer almaktadır (Rakovsky ve Zaikov 2009).

### **Tıbbi Ozonun Topikal Uygulama Biçimleri**

#### **Düşük basınçlı ozon gazı uygulaması**

Basınç düzeyi kişiye göre ayarlanabilmekte ve lezyona ait özelliklere göre değişebilmektedir. Sağaltımın özellikle dekübitis ile radyasyon hasarlarında ve fistüllerde yarar sağladığı bilinmektedir (Viebahn 1994).

#### **Transkutanöz ozon imersiyonu**

Geniş alana yayılmış enfekte olmuş yara sağaltımında ve varis ülserlerinde ozona karşı direnç gösteren plastik torba ve/veya çantaların kullanımı daha pratik olmaktadır. Ülserli veya yaralı alan 15 dk süresince karışım ile temas edilmesi gerekmektedir. Kalan atık O<sub>3</sub> ise katalizör aracılığıyla O<sub>2</sub>'ye dönüşmekte ve bu sayede solunum yolları ile ilgili tüm sorunlar elimine edilmektedir (Viebahn 1994).

#### **Ozonize su uygulaması**

Ozonize su uygulaması son zamanlarda yapılmış olan cerrahi müdahaleler ve enfekte olan her türlü yaralara karşı endike bir uygulamadır. Bu sağaltım şekli daha çok yara tedavisinde kullanılmakla birlikte en önemli endikasyonları; enfekte yaralar, yeni yaralar, liken, küfler ve mantar enfeksiyonları, otitis eksterna, herpes zosterdir (Viebahn 1994).

#### **Topikal rektal insüflasyon**

Kolit ve proktit sağaltımında kullanılan bir yöntemdir. (Rakovsky ve Zaikov 2009).

#### **Intraartiküler ozon enjeksiyonu**

Bu yöntem travmatik vakalarla uğraşılan alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Diz, omuz eklemleri başta olmak üzere kronik ve akut ağrılı eklem hastalıklarında yararlı ve etkili olduğu ispatlanmıştır. En önemli endikasyonları ise

akut eklemleri sorunları, gonartrozis, kronik omuz eklemi hastalıkları, kısmi sınırlı hareket fonksiyonları ve ağrılı hareketlerin tedavileridir (Sagai ve Bocci 2009).

### **Veteriner Cerrahide Ozon Sağaltımı ve Yapılan Çalışmalar**

Ozon uygulamasının organizmada meydana getirdiği temel etkiler sayesinde birçok hastalık sağaltımında kullanım alanı bulmuştur. Örnek olarak; iyileşmeyen yaralar ve purulent, peritonisitler, yıkımlayan pleura ve akciğer hastalıkları, dekübitislertermik travmalar, artropatiler, diyabetes mellitus komplikasyonu, arteriosklerozis, lumbal disk hernileri ve pankreatitler tedavisi gibi birçok alanda kullanılmaktadır (Bocci 2006b; Lu ve ark. 2010)

Dolphin ve Walker (1979), 200 kronik yaralı hastadan 187'sinin ozon sağaltımı sonunda iyileştiklerini bildirmişlerdir. Agrillo ve ark. (2007), mandibular osteomyelit sağaltımında ozon terapisinin etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Ozon uygulamasının eklem içerisinde anti-inflamatuvar etkisini, pro-inflamatuvar prostaglandin sentezini baskılayarak, bradikin salınımını inhibe ederek ve pro-inflamatuvar sitokin antagonistlerin salınımını ise artırarak göstermektedir (Elvis ve Ekta 2011).

Yu ve ark. (2017) kronik böbrek yetmezliğinde kronik böbrek inflamasyonunu kolaylaştıran ozon tedavisinin potensiyel hedefi olan inflamazomlardaki NLRP3 üzerine yaptıkları çalışmada ozon terapisinin böbrek koruyucu etkisini 5/6 nefroktomi uygulanan farelerde NLRP3 inflamazomunun modülasyonunun anti-inflamatuvar özelliği aracılığıyla başardığı tespit edilmiştir.

Ozon, metrit, endometrit, mastit, ürovajina, güç doğum ve sonrasında retensiyon sekondinarium gibi çeşitli durumlarda vaka şiddetini azaltmada yada tedavi de kullanılmaktadır (Zobel ve ark. 2012; Djuricic ve ark. 2014; Zobel ve ark. 2014).

İneklerde doğum sonu uterus enfeksiyonlarıyla sıklıkla karşılaşmaktadır. Uterusta meydana gelen yanığının şiddetiyle endometritis ve metritis gibi sorunlar meydana gelmektedir (Sheldon ve ark. 2008).

Polat ve ark. (2015) subklinik endometritli ineklerde intrauterin ozon ve rifaksimlin tedavisinin karşılaştırılması yönelik yaptıkları çalışmada sonuç olarak intrauterin ozon

sağaltımının, rifaksimim kadar güçlü tedavi edici özelliğinin olduğu ve endometritisli süt ineklerindedeki alternatif tedavi yöntemlerinden biri olarak kullanılabilirliği gözlemlenmiştir.

Djuricic ve ark. (2014) doğum sonrasında 24-36. Saatlerinde retensiyo sekundinarum olgulu ineklere ozonu ovül yapısında ve sprey aracılığıyla uterus içerisine uyguladıkları çalışmada retensiyo sekundinarum tedavisinde ozonu sprey ya da ovül formunda uygulamanın aynı etkiyi gösterdiği, bulgusuna varılmıştır.

Vesikovaginal refluks ya da ürine pooling olarak da bilinen ürovagina, vaginada ki kranial alanda idrar toplanması şeklinde tanımlanmaktadır. Kısırlara oranlar ineklerde fazla gözlenmesede her iki ırkta da infertiliteye sebep olabilmektedir (Parkinson 2001).

Zobel ve ark. (2012) yaptıkları çalışmalarında ürovajinal ineklerde transrektal masaj ile uterus ve vajina içerisine ki idrarı boşaldıktan 10 dakika sonra uterusun ve vajinanın içerisine uygulamışlar ve bu uygulamalardan 10 dakika sonra suni tohumlama yapmışlardır. Çalışma sonrasında ozon sağaltımının tohumlama sayısının gebelik başına düşen doğumun ve gebe kalma aralığının bununla birlikte kesime gönderilen inek sayısında azalmanın meydana geldiğini vurgulamışlardır.

Mastitis, süt veriminde ki azalmalar, süt yapısında oluşan değişiklikler, süt ve süt ürünlerinde kalite düşmesi, sütün satış değerlerinde azalmalar, sütün atılması, hayvan değerinde azalma ve elden çıkarılması gibi sorunlara neden olabilmektedir. Hayvanlar mastitisten ölmesi tedavi giderlerinin yanında büyük kayıplara neden olabilmektedir. Mastitisli hayvandan elde edilen süt yüksek miktarda mikroorganizma içermekte ve antibiyotik kalıntılarını da içermesinin yanında halk sağlığı açısından riskler oluşturabilmektedir. Mastitis, antibiyotik tedavisi uygulanmasıyla sütte bıraktığı kalıntı sütte dökülmeye neden olmakta ve ciddi sorunlara neden olmaktadır. Ozon uygulaması ise sütte kalıntı bırakmamakta ve halk sağlığı açısından güvenli, ekonomik bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. Aynı zamanda ozonun bakteri, maya, mantar, virüsler üzerindeki öldürücü etkisinden kaynaklı mastitis sağaltımında alternatif yöntemler arasında olduğu bilinmektedir (Ogata ve Nagahata 2000).

Ogata ve Nagahata (2000) yaptıkları çalışmalarında akut mastit tedavisinde ineklere meme içerisine ozon uygulamasıyla antibiyotik uygulamasını karşılatırmışlardır. Meme içerisine portatif tankla 500mg/saat ozon uygulanmış ve tedavi bitiminde elektro kondüktivimetre, Kaliforniya mastit test ve somatik hücre sayısında yapılan değerlendirmede %60 başarı sağlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca akut mastit tedavisinde kullanılan ozonun sütte kalıntı bırakmaması, maliyetinin uygun olması ve güvenilir olması, uygulama esnasında risk taşımaması avantajları arasında belirtilmektedir.

Kronik mastit olgularında laktasyonda olan 18 inekten kontrol grubuna 3 gün boyunca antibiyotik uygulandığı, 1. Gruptaki hayvanlara 7 gün boyunca 0.1 ppm ozon gazı, 2. Gruptaki hayvanlara ise 1 ppm ozon gazı uygulanmıştır. 1. Gruptaki hayvanlar tedaviden 7 gün sonra sütlerinde somatik hücre sayısında düşmenin görüldüğü fakat kontrol grubuna göre yüksek düzeyde olduğu 2. Grup hayvanlarda ise süt örneklerinde somatik hücrelerin önemli seviyede azalmış olduğu ve kontrol grubundan da düşük olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, 3 gün boyunca uygulanan 1 ppm ozon gazının mastitis sağaltımında etkili olduğu saptanmıştır (Joo ve ark. 2005).

Ozon gazı su ya da yağ ile karıştırılarak kullanılabilir. Liu ve ark. (2007) laktasyon evresinde olan 24 inekte 49 adet kronik mastitli meme lobunda yaptıkları araştırmalarında somatik hücre sayılarını incelemişlerdir. Kontrol grubu, A grubu, B grubu ve C grubu (sırasıyla; 7, 10, 14 ve 18 meme lobu) olarak ayırmışlardır. Kontrol grubuna 3 gün süresince norfloksasin, diğer çalışma gruplarına ise 3 gün süresince günde iki kez 10 mL ozonlanmış yağ verdikleri çalışmalarında kontrol grubunda somatik hücre sayısının ve bakteri sayısının önemsiz bir şekilde azaldığı diğer gruplardaki somatik hücre sayılarının önemli düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Fakat kontrol grubuyla diğer gruplarda ki SHS kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığını belirtmişlerdir.

## SONUÇ

Ozon gazı, tedavi edici özelliği keşfedildiğinde ilk olarak yara tedavisinde kullanılmış fakat günümüze kadar bir çok alanda alternatif sağaltım yöntemi olarak yerini almıştır. Ozonun sağaltımının kullanımına yönelik çalışmalar giderek artmakla beraber araştırma sonuçları incelendiğinde kullanılacak olan

ozon dozu, uygulama süresi ve sayısı açısından tam olarak ortak bir görüşe varılmadığı görülmektedir. Yapılan araştırmalardan elde edilen sonuçlar neticesinde; enjeksiyonlara düşük konsantrasyonlarla başlanarak yavaş yavaş artırılması bunun yanında hastanın hassasiyetine göre uygulama yönteminin doğru seçilmesi ve tedavi için uygun ortamın sağlanması, vakanın tipine göre tedavinin etkinliğini artırıcı kombine uygulamaların doğru seçilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Bütün bu sonuçların yanı sıra ozon uygulamasının tek başına kullanıldığında hastalığı tedavi edici yönünün çok etkili olmadığı fakat metabolizmanın tedaviye oluşturduğu cevabı oluşma hızını artırıcı yönde etkisinin olduğu tespit edilmiştir.

### KAYNAKLAR

- Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. (2007). Ozone Therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *J Craniofacial Surg*, 18(5):1071-1075.
- Anık A. (2007). İklimlendirme Sistemlerinde Ozon Kullanımının İncelenmesi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 102s, Ankara
- Bocci V. (2006a). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of Medical Research*, 37: 425-435.
- Bocci V (2006b). Is It True That Ozone Is Always Toxic? The End of A Dogma. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 216(3): 493-504.
- Bocci V (2007). Can Ozonotherapy Be Performed. If The Biochemistry Of The Process Cannot Be Controlled. *Archives Of Medical Research*, 38:584-585.
- Bocci VA, Zanardi I, and Travagli V. 2011. Ozone Acting On Human Blood Yields A Hormetic Dose-Response Relationship. *J Transl Med*, 9: 66-59.
- Çağlaroğlu Ç. 2011. Farklı Seviyelerde Ozon Kullanımının Erzurum İli İçme Suyunun Bazı Fiziksel, Kimyasal ve Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, 62s, Erzurum.
- Djuricic D, Lipar M, Samardzija M. (2014). Ozone Treatment Of Metritis And Endometritis In Holstein Cows. *Vet Arhiv*, 84(2):103-110.
- Dolphin S, Walker M. (1979). Healing Accelerated By Ionozone Therapy. *Physiotherapy*, 65(3):81-82.
- Elvis AM, Ekta JS. (2011). Ozone Therapy: A Clinical Review. *J Nat Sci Biol Med*, 2(1):66-70.
- Güzel Ö, Yıldar E, Erdikmen DO (2011). Medical Ozone and Its Use In Veterinary Surgery. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 37(2):177-184.
- Jakab GJ, Spannhake EW, Canning BJ, Klee-Berger SR, Gilmour MI. (1995). The Effects of Ozone On Immune Function. *Environ Health Persp*, 103(2):77-89.
- Kim JG, Yousef AE and Dave S (1999). Application of for Enhancing. The Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. *J. Of Food Protect*, 62(9): 1071-1087.
- Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM (2009). Therapeutic Effects of Topical Application of Ozone On Acute Cutaneous Wound Healing. *Journal of Korean Medical Science*, 24:368-374.
- Kucuksezer UC, Zekiroglu E, Kasapoglu P, Adin-Cinar S, Aktas-Cetin E, Deniz G. (2014). A Stim- Ulatory Role of Ozone Exposure On Human Natural Killer Cells. *Immunol Invest*, 43(1): 1-12.
- Kutlubay Z, Engin B, Serdaroğlu S, Tüzün Y. (2010). Dermatolojide Ozon Tedavisi. *Dermatoz*, 1(4):209-216.
- Li LJ, Yang YG, Zhang LL, Nie SF, Li Z, Li F, Hua HY, Hu YJ, Zhang HS, Guo YB. (2007). Protective Effects of Medical Ozone Combined with Traditional Chinese Medicine Against Chemically-Induced Hepatic Injury in Dogs. *World Journal Gastroenterolgy*, 45:5989-5994
- Lu W, Li YH, He XF. (2010). Treatment of Large Lumbar Disc Hemiation with Per-Cutaneous Ozone Injection Via The Posterior-Lateral Route and Iner Magrin of the Facet Joint. *World Journal of Radiology*, 2:109-112.
- Mahapatra AK, Muthukumarappan K, Julson JL. (2005). Applications of Ozone, Bacteriocins and Irradiation in Food Processing: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 45(6):447-61.
- Mendiratta S, Qu ZC, May JM. (1998). Erythrocyte Ascorbate Recycling: Antioxidant Effects in Blood. *Free Radic Biol Med*,

24(5):789-797.

Ogata A, Nagahata H. (2000). Intramammary Application of Ozone Therapy to Acute Clinical Mastitis in Dairy Cows. *J Vet Med Sci*, 62(7):681- 686.

Oleg V, Maslennikov A, Claudia N, Kontorshchikova C, Irina A. (2008). Ozone Therapy In Practice. Health Manual. Nizhny Novgorod.

Parkinson T. (2001): Urovagina. 399. In: DE Noakes, TJ Parkinson, GCW England (Ed), Arthur's Veterinary Reproduction And Obstetrics. Saunders, Philadelphi.

Polat B, Cengiz M, Çolak A, Cannazik O. (2015). Comparison Of Intrauterine Ozone And Rifaximine Treatment In Cows With Subclinical Endometritis. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(5):773-776.

Rakovsky S and Zaikov G. (2009). Application of Ozone In Medicine. *Chemistry and Chemical Technology*, 3:3.

Romero R, Espinazo J, Mazor M. (2004). Can En-Dometrial Infection/Inflammation Explain Implantation Failure, Spontaneous Abortion and Preterm Birth After In Vitro Fertilization? *Fertil Steril*, 82(4):779-804.

Sagai M, Bocci V. (2011). Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is Healing Induced Via A Mild Oxidative Stress? *Medical Gas Research*, 1:29.

Schaur RJ. (2003). Basic Aspects of the Biochemical Reactivity of 4-Hydroxynonenal. 24: 149-159.

Sharma M, Hudson JB. (2008). Ozone Gas is an Effective and Practical Antibacterial Agent. *Am J Infect Control*, 36(8):559-563.

Sheldon MI, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. (2008). Uterine Diseases In Cattle After Par- Turition. *Vet J*, 176(1):115-121.

Snyder SH. (2001). Baranano DE Heme Oxygenase: A Font Of Multiple Messengers *Neuropsychopharmacology*, 25(3):294-298.

Ünal, D., (2017). Ozon uygulaması ve Oksijen Tutucu Kullanımının Modifiye Atmosferde Ambalajlanan Tavuk Etinin Kalitesi Üzerine Etkileri. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 87s, Ankara.

Viebahn R. (1994).The Use Of Ozone In Medicine. 2nd Ed.. Heidelberg: Karl F. Haug Publishers, 1-178.

Zobel R, Tkalčić S, Stoković I, Pipal I, Buić V. (2012). Efficacy Of Ozone As A Novel Treatment Option For Urovagina In Dairy Cows *Reprod Domest Anim*, 47(2):293-298.

Zobel R, Martinec R, Ivanovic D, Rosic N, Stancic Z, Zerjavic I. (2014). Intrauterine Ozone Administration For Improving Fertility Rate In Simmental Cattle. *Vet Arhiv*, 84(1):120-123.

## Taş Mescit (Cemaleddin Ferruh Dârulhadîsi)

Moloz taştan yapılması sebebiyle tamamen yıkılmış olan şifahane kısmı, Anadolu Selçuklu Hükümdarı I. Alâeddin Keykubat zamanında Çankırı Atabeyi (Valisi) Cemalettin Ferruh tarafından 1235 yılında yaptırılmıştır. Cemalettin Ferruh şifahaneye ilave olarak 1242 yılında bir Dâr-ül Hâdis inşa ettirmiştir. Anadolu'daki ilk Dâr-ül Hâdis olan eser halk tarafından Taş Mescit olarak isimlendirilmektedir. Mimari özelliğinin yanı sıra yapıya önem kazandıran diğer husus iki plastik sanat eseridir. Biri yapı üzerinde, diğeri heykel görünümünde olan iki adet figürlü taş eserden birbirine dolanmış iki yılanın tasvir edildiği ve günümüzde “**Tıp Sembolü**” olarak kullanılan birinci parça yapı üzerinde bulunmaktadır. Çankırı Müzesinde sergilenen ikinci parçada ise günümüzde “**Eczacılık Sembolü**” olarak kullanılan kupaya dolanmış yılan figürü bulunmaktadır.



**Eurasian Journal of Health Sciences**  
**Avrasya Sağlık Bilimleri Dergisi**