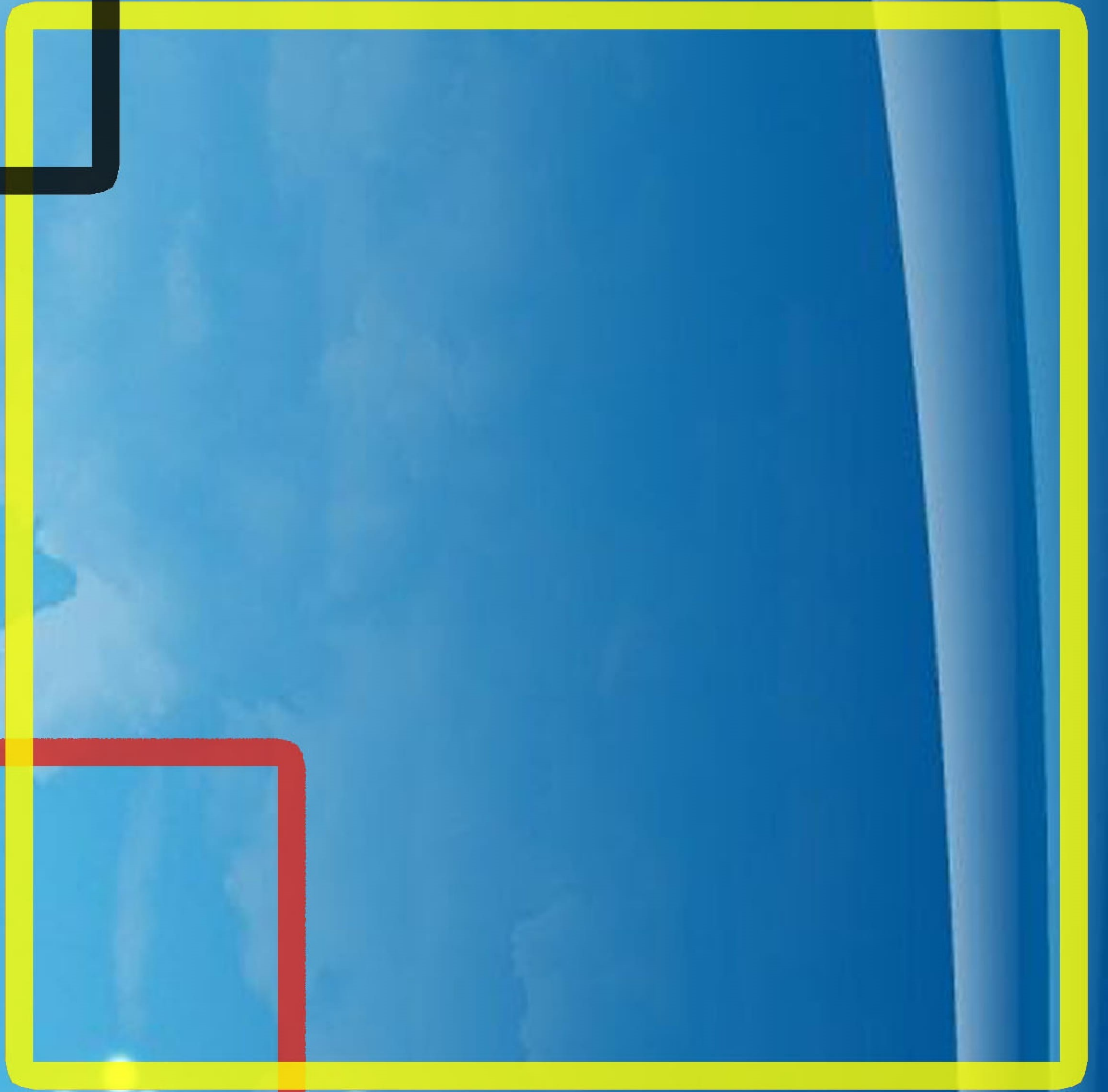




VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2020 / Volume: 31 / Issue:2

ISSN : 2149-3359
e-ISSN : 2149-8644





July - 2020



VAN VETERINARY JOURNAL

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

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT

Van YU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu

Kampus / Van - Turkey

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

e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors (Editorial Board)

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)

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

Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)

Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Section Editor)

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

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

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

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

Publication Board

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

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

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

Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)

Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

Dr. Omar ATROOZ (Mutah, JORDAN)

Dr. Ornampai Japa (Univ. of Phayao, THAILAND)

Scientific Board of This Issue

Assist. Prof. Dr. Ulas ACAR OZ (Univ of Afyon Kocatepe)

Assist. Prof. Dr. Omer AKGUL (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

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

Assoc. Prof. Dr. Fulya USTUN ALKAN (Univ. of Istanbul-Cerrahpasa)

Prof. Dr. Meral AYDENIZ OZ (Univ. of Kirikkale)

Res. Assist. Dr. Alper BAYRAKAL (Univ. of Istanbul-Cerrahpasa)

Prof. Dr. Enver BEYTUT (Univ. of Kafkas)

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

Assist. Prof. Dr. Burcak ASLAN CELIK (Univ of Siirt)

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

Prof. Dr. Nurcan DONMEZ (Univ. of Selcuk)

Assoc. Prof. Dr. Sibel YASA DURU (Univ. of Kirikkale)

Prof. Dr. Ozlem DERINBAY EKICI (Univ. of Selcuk)

Assoc. Prof. Dr. Nazli ERCAN (Univ of Cumhuriyet)

Prof. Dr. Gulsen GONCAGUL (Univ. of Burdur Mehmet Akif Ersoy)

Prof. Dr. Mehmet GUL (Univ of Ataturk)

Assist. Prof. Dr. Ozgul GULAYDIN (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assoc. Prof. Dr. Ramazan ILGUN (Univ. of Aksaray)

Prof. Dr. Sinan INCE (Univ of Afyon Kocatepe)

Assist. Prof. Dr. Cagri KALE (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Assist. Prof. Dr. B. Irem OMURTAG KORKMAZ (Univ. of Marmara)

Assoc. Prof. Dr. Sevda PEHLIVANLAR ONEN (Univ of Mustafa Kemal)

Assoc. Prof. Dr. Burcu ONUK (Univ of Ondokuz Mayis)

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

Assist. Prof. Dr. Omer SEVIM (Univ of Aydin Adnan Menderes)

Prof. Dr. Ibrahim TASAL (Univ. of Burdur Mehmet Akif Ersoy)

Assist. Prof. Dr. Rabia Mehtap TUNCAY (Univ. of Van Yuzuncu Yil)

Prof. Dr. Armagan Erdem UTUK (Univ. of Cukurova)

Assist. Prof. Dr. Halil YALCIN (Univ. of Burdur Mehmet Akif Ersoy)

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

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: **Van Vet J**

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

Year	Volume	Issue
2020	31	2

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, Chemical Abstract, ROOT INDEXING, J-Gate, COSMOS IF, DRJI, ResearchBib, Turkiye Atif Dizini and Google Scholar

Original Articles

- **Erçetin E, Çetin Y.** Sütçü İneklerde Postpartum Rutin İntrauterin Tedavilerin Fertiliteye Etkisi (Effect of Postpartum Routine Intrauterine Treatment on Fertility in Dairy Cows) **60-66**
- **Yıldız S, Tekeli A, Demirel M, Aldemir R, Yörük İH, Belhan S, Koşal V.** Soğuk Stresi Altında Yetiştirilen Yumurtacı Tavukların Rasyonlarına Farklı Düzeylerde Katılan Kuşburnu Meyvesinin Yumurta Verimi ve Özellikleri ile Canlı Ağırlık Değişimi ve Yemden Yararlanma Üzerine Etkisi (The Effect of Dietary Supplemental Levels of Rosehip Fruit on Egg Yield and Characteristics and Live Weight Change and Feed Conversion Ratio of Cold Stressed Laying Hen Diet) **67-73**
- **Omurtag Korkmaz Bİ, Korkmaz S, Yüce M, Soyogul Gürer Ü.** Microbiological Risks and Portion Analyse of Stuffed Mussels Sold in Istanbul (İstanbul'da Satılan Midye Dolmalardaki Mikrobiyolojik Riskler ve Porsiyon Analizi) **74-77**
- **Sancak H, Sağun E.** Presence and Prevalence of *Listeria* Species in the İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811)* (İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) *Listeria* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı) **78-82**
- **Bozukluhan K, Merhan O, Kızıltepe Ş, Harmankaya A, Gökçe G.** Toksoplazmozisli Koyunlarda Oksidatif Stres ve Seruloplazmin Düzeylerinin Belirlenmesi (Determination of Oxidative Stress and Ceruloplasmin Levels in Sheep with Toxoplasmosis) **83-86**
- **Aktaş İ, Sevimli M.** Protective Effects of Silymarin on Brain Injury in Rats (Sıçanlarda Silimarinin Beyin Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi) **87-92**
- **Bingöl NT, Karşlı MA, Altaçlı S, Kale Ç, Bolat D.** Farklı Düzeylerde Bezelye Katılan Yumurta Tavuğu Rasyonlarına Enzim İlavésinin Performans Üzerine Etkileri (The Effects of Enzyme Addition Into The Ration Consisting of Different Levels of Pea on Laying Hens's Performance) **93-98**
- **Erol Esim S, Özdal N, Oğuz B.** Van İlinde Koyunlarda *Fasciola hepatica* Prevalansının Koproantijen-Elisa ve Dışkı Muayene Yöntemleri ile Karşılaştırmalı Araştırılması (Comparative Investigation of *Fasciola hepatica* Prevalence by Coproantigen-Elisa and Stool Examination Methods in Sheep in Van Province) **99-104**
- **Karakurt E, Dağ S.** Hepatoprotective Effect of Silymarin Against Diethylnitrosamine Induced Oxidative and Nitrosative Stress in Rats (Ratlarda Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Oksidatif ve Nitrozatif Strese Karşı Silimarın'ın Karaciğer Koruyucu Etkisinin Araştırılması) **105-110**
- **Tavşanlı H, Kısadere İ.** Influence of Oral Melatonin Administration on Oxidative Stress and İntestinal Microflora in Rats Exposed to Cadmium (Kadmiyuma Maruz Kalan Ratlarda Oral Melatonin Uygulamasının Oksidatif Stres ve Bağırsak Mikroflorası Üzerine Etkisi) **111-116**



Effect of Postpartum Routine Intrauterine Treatment on Fertility in Dairy Cows

Egemen ERÇETİN^{1*} Yunus ÇETİN²

¹ Veterinary Surgeon, Kırklareli, Turkey

² Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary, Department of Obstetrics and Gynecology, Burdur, Turkey

Received: 22.04.2019

Accepted: 19.02.2020

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine effect of postpartum routine intrauterine dimethyl sulfoxide (DMSO), DMSO + oxytetracycline and intramuscular PGF₂α administration on fertility in cows. For this purpose, 150 cows were randomly divided into 3 groups for this study. Vaginal discharge and uterine size were scored with varying degrees from 1 to 3. DMSO group (n = 47) first in the postpartum interval of 25 to 35 days, secondly in the postpartum interval of 40 to 55 days, were twice administered 120 ml from 25% DMSO as intrauterine. In addition, PGF₂α was administered at a luteolytic dose. For the DO group (n=46), first in the postpartum interval of 25 to 35 days in postpartum, secondly in the postpartum interval of 40 to 55 days, were twice 25% DMSO and 4 g oxytetracycline, all diluted with serum physiologic were administered 120 ml as intrauterine. Furthermore, PGF₂α was also given at the luteolytic dose. To the prostaglandin group (n=42) PGF₂α was given twice intramuscular luteolytic dose, firstly in 25-35 days and secondly in postpartum 40-55 days. Number of artificial insemination for one pregnancy, in cows with a vaginal discharge score of 1, was accepted significantly lower than a vaginal discharge score of 2-3 (p<0.05). In antibiotic group, pregnancy rates did not differ according to PGF₂α and DMSO usage. In early postpartum period, the use of intrauterine antibiotics was concluded that the effect on fertility parameters was not different from PGF₂α and DMSO. It was concluded that intrauterine routine use of DMSO improves fertility proportionally but more cows should be studied.

Keywords: Dimethyl Sulfoxide, Fertility, Cow, Intrauterine, Routine

öz

Sütçü İneklerde Postpartum Rutin İntrauterin Tedavilerin Fertiliteye Etkisi

Bu çalışmada, ineklerde postpartum rutin intrauterin Dimetil Sülfür Oksid (DMSO), DMSO + oksitetrasiklin ve intramuskular PGF₂α uygulamalarının fertiliteye etkisini belirlemek amaçlandı. Bu amaçla 150 baş inek rastgele 3 gruba ayrıldı. Vajinal akıntıları ve uterus boyutları 1'den 3'e değişen ölçüde skorlandı. DMSO grubuna (n=47) postpartum 25-35 gün aralığında ilki, postpartum 40-55 gün aralığında ikincisi olmak üzere iki defa serum fizyolojikle seyreltilen %25'lik DMSO 120 ml intrauterin olarak verildi. Ayrıca PGF₂α luteolitik dozda uygulandı. DO grubuna (n=46), postpartum 25-35 gün aralığında ilki, postpartum 40-55 gün aralığında ikincisi olmak üzere iki defa serum fizyolojik ile seyreltilen %25'lik DMSO ve 4 gr oksitetrasiklin 120 ml intrauterin olarak verildi, PGF₂α luteolitik dozda uygulandı. PG grubuna (n=42) 25-35 gün aralığında ilki, postpartum 40-55 gün aralığında ikincisi olmak üzere iki defa kas içi PGF₂α luteolitik dozda uygulandı. Vajinal akıntı skoru 1 olan ineklerde gebelik başı tohumlama sayısı akıntı skoru 2-3 olanlara göre anlamlı derecede düşük bulundu (p<0.05). Antibiyotik kullanılan grupta gebelik oranları PGF₂α ve DMSO kullanımına göre farklılık göstermedi. Erken postpartum dönemde intrauterin antibiyotik kullanımının fertilité parametrelerine etkisinin PGF₂α ve DMSO'dan farklı olmadığı sonucuna varıldı. DMSO'nun intrauterin rutin kullanımının oransal olarak fertilitéyi iyileştirdiği ancak daha fazla sayıda inekte çalışılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dimetil sulfo oksid, Fertilité, İnek, İntrauterin, Rutin

GİRİŞ

İneklerde doğum sonrası üreme performansı birçok farklı sebepten etkilenmektedir. İneğin laktasyon sayısı, postpartum dönemde vücut kondüsyon skoru (VKS) kaybı, doğum mevsimi, ketozis, hipokalsemi, uterus enfeksiyonları gibi nedenler üreme performansını

etkilemektedir (Armengol ve Fraile 2015). Postpartum dönemde sıklıkla karşılaşılan uterus enfeksiyonları, konsepsiyon oranını azaltmakta, doğum-ilk tohumlama aralığını uzatmaktadır. İneklerde sıklıkla karşılaşılan uterus enfeksiyonları, akut puerperal metritis, klinik endometritis ve subklinik endometritis şeklinde üç başlık olarak incelenmektedir. Akut puerperal metritis,

*Corresponding author: egemenercetin@hotmail.com

*This research article was summarized from the first author's master thesis.



postpartum 21 gün içerisinde, anormal büyümüş uterus, kırmızı-kahve renkte uterus akıntısı, 39.5 °C ateş, sistemik enfeksiyon belirtileri, süt veriminde düşüş, durgunluk ve toksemi bulgularının seyrettiği uterus enfeksiyonu olarak tanımlanmaktadır. Postpartum 21. günden sonra vaginada purulent bir akıntının görüldüğü, sistemik bulguların eşlik etmediği uterus enfeksiyonlarına klinik endometritis denilmektedir. Klinik endometritiste servikal çap 7.5 cm ve üzeri olarak tespit edilmektedir. Süt ineklerinde klinik endometritis prevalansı 15-60. günler arasında %23.6 ile %42.6 arasında değişmektedir (Okawa ve ark. 2017). Postpartum dönemde klinik belirti göstermeyen ineklerde subklinik endometritisler görülebilmektedir. Klinik olarak endometritis görülmeyen ancak fertilitate problemi olan ineklerden, sitobrush yöntemi ile uterus örneği alınıp polimorfonükleer (PMN) hücre sayısı araştırması yapılmış, düşük gebelik ile yüksek PMN arasında ilişki bulunduğu bildirilmiştir. Bu durumda subklinik endometritis tanısının uygun olacağı Kasimanickam ve ark. (2004) tarafından belirtilmiştir.

Endometritis nedeniyle oluşan ekonomik kayıpların en aza indirilmesi için en kısa sürede tedaviye başlanması gerekmektedir. Endometritis tedavisinde amaç yangısal değişikliklerin sonlandırılarak fertilitenin devamının sağlanmasıdır (Aslan ve ark. 1995; Sheldon ve ark. 2006; Azawi 2008). Tedavide antibiyotik, hormon, fitoteropetik ajan, antiseptik solüsyonu gibi maddeler intrauterin, parenteral ya da kombine olarak kullanılabilir. Etkili bir endometritis tedavisi uterustaki inflamasyonu durdurmalı ve uterusun patojen bakteri yükünü immün sistemin baş edebileceği seviyelere düşürmelidir. Bunları yaparken uterusun savunma sistemini bozmamalı ve endometriyumda kalıcı hasarlar bırakmamalıdır (LeBlanc ve ark. 2002). Endometritis tedavisi parenteral tedavi, intrauterin tedavi veya her iki tedavinin beraber uygulanması gibi seçenekleri içermektedir. Parenteral endometritis tedavisi genellikle puerperal metritis olgularında tercih edilmektedir. Sıklıkla antimikrobiyal ajan ve hormonlar kullanılmaktadır. Klinik endometritislerde ise çeşitli antibiyotik ve antiseptik ajanlar intrauterin yolla yaygın olarak kullanılmaktadır. Fakat bunların çoğu intrauterin uygulama lisansına sahip değildir (Pascotini ve ark. 2016). Intrauterin yolla en çok tetrasiklinler kullanılmasına karşın etkinlikleri tartışmalıdır (Armengol ve Fraile 2015). Intrauterin antibiyotik seçimi yaparken, antibiyotiğin endometriyuma irritan etkisi, anaerobik ortamdaki etkinliği, uterusun derin dokularına yayılabilme kapasitesi ve sütte kalıntı durumu dikkate alınmalıdır (Noakes ve ark. 2001). Özellikle dirençli uterus enfeksiyonlarında, etken maddelerin uterusun derin katmanlarına ulaşabilmesi için taşıt madde olarak Dimetil Sulfo Oksid (DMSO) kullanımının yararlı olabileceği bildirilmektedir (Küplülü ve ark. 2011). Dimetil Sulfo Oksid ilk olarak 1866 yılında Rus bilim insanı Alexander Zaytsev tarafından sentezlenen bir organosülfür bileşimidir. Bu renksiz sıvı polar ve polar olmayan bileşikler çözen, suyun yanında birçok farklı organik çözücü ile karışabilen polar aprotik çözücüdür (Wexler 2005). Birçok farklı tıbbi kullanım alanı bulunan DMSO'nun farmakolojik etkileri zar penetrasyonu, antienflamatuvar özelliği, sinir blokajı etkisi ile lokal analjezik etkisi, bazı bakteri türlerinde bakteriyostatik etkisi, diürezis etkisi olduğu, eş zamanlı uygulanan bir ilacın aktivitesini arttırabileceği, kollajen için çözücü olduğu, immünite ve vazodilatasyonda nonspesifik olarak artışa etkisi de dahil olmak üzere geniş bir primer farmakoloji alanı bulunduğu belirtilmiştir. Dimetil Sulfo Oksid, canlıların vücut zarlarını tahrip etmeden bir zarı

kolayca geçebilmektedir. Bu geçiş esnasında bir dizi başka bileşiklerinde geçişine izin vermektedir. Dokuları iskemi etkisine neden olabilecek durumlardan koruyabileceği belirtilen DMSO'nun, vazodilatasyonu ve trombosit agregasyonunu da inhibe ettiği belirtilmektedir. Kan dolaşımı kanallarını açık tutarak hücreler arası doku ödemi azalttığı bildirilmiştir (Ley ve ark. 1989). Doku yaralanması, dokularda iltihap ve eksüdasyon, hipoksik hasarlar, bağ doku nekrozuna neden olan bağ doku proliferasyonu, dolayısıyla belirli bir dereceye kadar skarlaşma meydana getiren vasküler yanıtla sonuçlanmaktadır (Ley ve ark. 1989).

Sürü fertilitatesinin optimum şartlarda devamı için postpartum 3. haftadan sonra devam eden endometritis olgularının tedavi edilmesi gerekmektedir. Anormal vaginal akıntı bulunmayan ineklerde de uterus enfeksiyonu bulunabilmektedir (Sheldon ve ark. 2006). Özellikle vaginitis ve metritis olgularının klinik muayene yöntemleri ile tam olarak ayrımının yapılamaması, subklinik endometritis teşhisi için sahada sitolojik yöntemlerin uygulama zorluğundan dolayı endometritis teşhisi kolaylaşmadan doğum sonrası bütün ineklerin tedaviye alınmasının faydalı olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla çalışmada postpartum 25-35 ve 40-55. günlerde, endometritis olup olmamasına bakılmaksızın yapılan rutin intrauterin tedavilerin gelecek fertilitate üzerine etkileri araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada toplam iki farklı işletmede bulunan 150 baş Holstein ırkı hayvan kullanıldı. Çalışma için Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Etik Kurulu tarafından 271 numaralı etik kurul raporu onayı alınmıştır. Hayvanlar doğumdan sonra çiftlik şartlarında, işletmenin rutin düzenine uygun olarak hazırlanan karma rasyon ile beslendi. Add libidum olarak ve sürekli ulaşabilecekleri yerlerde yeterli miktarda su bulunduruldu. İneklerde muayene ve tedavi sonrasında yapılan suni tohumlama uygulamaları, tecrübeli bir teknisyen ya da veteriner hekim tarafından gerçekleştirildi. Araştırmada kullanılan ineklerin güç doğum durumları, yavru zarlarının atılma zamanı, metabolik, enfeksiyöz hastalık durumları kayıt altına alındı. Hayvanlara postpartum 25-35 günler arasında rektal muayene uygulanarak uterusun involüsyon durumu, akıntı varsa skorlaması yapıldı. Buna göre uterus invole olmuş ve pelvik çatı içinde ise (1. derece), uterus normalden büyük ve pelvik çatıdan biraz sarkmış ise (2. derece), uterus belirgin şekilde büyük ve karın boşluğuna doğru sarkık ise (3. derece) şeklinde puanlandı.

Vaginal akıntı puanlaması; akıntı yok veya saydam müköz ise (1. derece), yer yer purulent partiküller içeren müköz akıntıysa (2. derece), çok miktarda purulent akıntıysa (3. derece) şeklinde yapıldı. Bu muayeneler gerçekleştirirken 5'lik sisteme göre vücut kondisyon skorları da kaydedildi. Postpartum 40-55 günlerde rektal muayene ve akıntı skorlaması aynı skala kullanılarak tekrarlandı. Genel durumu bozuk, klinik ve metabolik olarak sorunlu, şiddetli tırnak hastalığı olan, ketozis tedavisi gören, abomasum deplasmanı geçiren, ovaryum kisti bulunan ve çalışma sırasında mastitis tedavisi gören inekler araştırmadan çıkartıldı. İnekler uterustan gelen içeriğe ve involüsyon durumlarına bakılmaksızın, rastgele olarak her gruptaki hayvan sayısı eşit olacak şekilde 3 farklı gruba ayrıldı. Bu gruplar DMSO, DO ve PG olarak isimlendirildi.

Grup DMSO: Bu gruptaki ineklere ilk uygulama postpartum 25-35 gün aralığında, ikinci uygulama postpartum 40-55 gün aralığında olacak şekilde iki defa serum fizyolojikle

seyreltilen %25'lik DMSO (Dimethyl Sulfoxide Extra Pure Emlura; Merck Millipore Co., Germany)'dan 120 ml intrauterin olarak verildi. Ayrıca intrauterin tedavi günlerinde kas içi olarak PGF2 α (Gestavet Prost; Laboraorios Hipra Girona, Spain) luteolitik dozda uygulandı.

Grup DO: Bu gruptaki ineklere ilk uygulama postpartum 25-35 gün aralığında, ikinci uygulama postpartum 40-55 gün aralığında olacak şekilde iki defa serum fizyolojik ile seyreltilen %25'lik DMSO ve 4 gr oksitetrasiklin (Primavilin LA; Vilsan, Ankara, Türkiye) 120 ml intrauterin olarak verildi. Ayrıca intrauterin tedavi günlerinde kas içi olarak PGF2 α luteolitik dozda uygulandı.

Grup PG: Bu gruptaki ineklere ilk uygulama postpartum 25-35 gün aralığında, ikinci uygulama postpartum 40-55 gün aralığında olmak üzere iki defa kas içi PGF2 α luteolitik dozda uygulandı.

Tüm gruplarda postpartum 70 gününü dolduran inekler 10 gün doğal kızgınlık için izlendi. Uygulama sonrası postpartum 70. günden sonra tüm gruplarda 10 gün boyunca doğal kızgınlık takipleri yapıldı. Kızgınlık takipleri sabah ve akşam saatlerinde klinik gözlem ayrıca pedometre kayıtlarının izlenmesi yolu ile takip edildi. Doğal kızgınlık göstermeyen inekler ovsync yöntemi ile tekrar senkronize edilerek tohumlandı. Tohumlanan ineklerde 30 gün sonra transrektal USG yöntemi ile gebelik teşhisleri yapıldı. USG kontrolünde gebelik negatif sonuç veren inekler işletmenin rutin reproduksiyon yönetimine göre takip edildi. Uygulama gruplarında bulunan ineklerde yeniden klinik endometritis teşhisi yapıldığında ise 50 cc (Primavilin LA; Vilsan, Ankara, Türkiye) intrauterin oksitetrasiklin tedavisi uygulandı ve kayıt altına alındı.

Postpartum yaklaşık 240 günü dolduran ineklerde grup başına gebelik oranı, açık gün ortalama sayısı, gebelik başına tohum sayısı, ilk tohumlama gebelik oranı gibi fertilitate parametreleri incelendi. Çalışma boyunca toplamda 15 adet hayvan genel durum bozukluğu, klinik metabolik hastalık, şiddetli tırnak enfeksiyonu, mastitis vb.

nedenlerden dolayı ikinci muayene-tedavi uygulamaları yapılmadan çalışmadan çıkarıldı.

Gebelik başına tohumlama sayısı = Tohumlanan hayvan sayısı / Gebe kalan hayvan sayısı,

Gebelik oranı = (Gruptaki gebe hayvan sayısı/ Gruptaki tüm hayvanların sayısı) X 100 şeklinde hesaplanmıştır.

Gruplarda açık gün ortalaması hesaplamasında ise hayvanların doğumundan gebe kaldığı aralığa kadar olan süre alınmıştır. Çalışma bittiği gün gebe kalmayan hayvanlar, sağlan gün sayısı alınarak ortalama dâhil edilmiştir.

İstatistiksel analiz

Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı'nda SPSS programı kullanıldı, sonuçlar ortalama \pm standart sapma (SD) şeklinde verildi. P<0.05 değerleri anlamlı kabul edildi. Tüm gruplara ait deneklerin uterus skorları ve akıntı skorları için tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Akıntı skorlaması ve gebelik başına tohumlama sayıları, hayvanların gruplara göre gebelik oranları, ilk tohumlama sağmal gün ortalaması, ilk tohumlama gebelik oranı, açık gün sayısı, ortalama sağmal gün sayısı ve 3 tohumlama sonrasında gebelik bulguları gibi fertilitate parametrelerini değerlendirmek için Pearson ki-kare testi uygulandı. Ayrıca, uterus boyutlarına göre açık gün ortalamalarında farklılıklar tek yönlü varyans analizi ve Tukey testi uygulanarak değerlendirildi.

BULGULAR

Tüm gruplar için 1. ve 2. muayene bulgularına göre ortalama uterus skorları, ortalama akıntı ve VKS skorları Tablo 1'de gösterilmiştir. Sadece DMSO grubunda dört inekte birer defa daha intrauterin oksitetrasiklin uygulamasıyla endometritis tedavisi yapılmıştır.

Gruplar arasında 1. ve 2. muayenede uterus skorları ve akıntı skorları arasında istatistik olarak önemli bir fark görülmedi (P > 0.05).

Tablo 1. Muayenelerde belirlenen ortalama uterus skorları, ortalama akıntı ve VKS skorları (P>0.05)

Table 1. Average uterine, vaginal discharge and body condition scores determined in examinations (P>0.05)

Gruplar	DMSO (n=47)	DO (n=46)	PG (=42)
1. Muayene Uterus Skorları	1.5 \pm 0.6	1.2 \pm 0.6	1.5 \pm 0.5
2. Muayene Uterus Skorları	1.2 \pm 0.5	1.1 \pm 0.5	1.3 \pm 0.4
1. Muayene Akıntı Skorları	1.1 \pm 0.6	1.1 \pm 0.6	1.7 \pm 0.5
2. Muayene Akıntı Skorları	1 \pm 0.4	1.1 \pm 0.4	1 \pm 0.1
1. Muayene VKS skorları	2.9 \pm 0.3	2.7 \pm 0.2	2.9 \pm 0.3
2. Muayene VKS skorları	3 \pm 0.3	2.9 \pm 0.2	2.9 \pm 0.2
Uygulama Sonrası Endometritis	4	-	-

Tablo 2. Grup ayrımı yapılmadan vaginal akıntı skorlaması ve fertilitate parametreleri

Table 2. Vaginal discharge scoring and fertility parameters without group discrimination

	Akıntı Skor 1 (n=113)	Akıntı Skor 2 ve 3 (n=22)	P Değeri
Gebelik Oranı	82.30% ^a	63% ^b	P<0.05
Gebelik Başına Tohum Sayısı	3.6 \pm 2.1 ^a	6 \pm 2 ^b	P<0.05
Açık Gün Ortalaması	152 \pm 75.8	175 \pm 81.9	P>0.05

Tablo 3. Grup ayrımı yapılmadan uterus skorlaması ve fertilitte parametreleri**Table 3.** Uterine scores and fertility parameters without group discrimination

Gruplar	Uterus Skor 1 (n=72)	Uterus Skor 2 (n=53)	Uterus Skor 3 (n=10)	P Değeri
Gebelik Oranı	72% ^{ab}	86% ^a	50% ^b	P<0.05
Gebelik Başına Tohum Sayısı	3.6±2.1 ^a	3.8±2.1 ^b	7.2±2.5 ^{ab}	P<0.05
Açık Gün Ortalaması	151.8±76.1	156±77.2	186.7±83.5	P>0.05

Tablo 4. Gruplarda bazı fertilitte parametreleri (p>0.05)**Table 4.** Some fertility parameters in groups (p>0.05)

Gruplar	DMSO (n=47)	DO (n=46)	PG (n=42)
Grup gebelik oranı	%87(41/47)	%71.73(33/46)	%78(33/42)
Doğum-ilk tohumlama aralığı	78.1±27.6	90.1±29.9	81±27.8
İlk tohumlama gebelik oranı	%31.91 (15/47)	%34.78 (16/46)	%33 (14/42)
Gebelik Başına Tohum Sayısı	2.43	2.66	2.33
Açık Gün Ortalaması	149±75.9	171±74.6	147±80.1
Sağılan gün sayısı *	241.2	240.1	243.3
3 tohumlama sonrası gebelik oranı	%74 (35/47)	%65 (30/46)	%62 (26/42)

* Fertilitte değerlendirmelerinin günü baz alınmıştır.

Grup ayrımı yapılmaksızın oluşturulan akıntı skorlaması ve fertilitte parametreleri Tablo 2'de belirtilmiştir. Akıntı skorlaması ve gebelik başına tohumlama sayıları arasında ise istatistiki olarak önemli bir fark bulunmuştur (P<0.05). Gebelik oranı, akıntı skoru 1 olan hayvanlarda 2-3 olanlara göre daha yüksek bulundu (P <0.05). Akıntı skorlamaları ile açık gün sayısı arasında istatistiki olarak fark bulunmamıştır. Açık gün sayısı ile akıntı skoru arasında fark bulunmasa da skor 2-3 olan hayvanlarda ortalama açık gün sayısı daha yüksek tespit edilmiştir. Ayrıca gruplar arasında akıntı ve uterus muayene skorlamaları arasında istatistiki açıdan bir fark bulunmasa da 2. muayenelerde oransal olarak bir iyileşme olduğu saptanmıştır. Grup ayrımı yapılmaksızın oluşturulan uterus skorlaması ve fertilitte parametreleri tabloda belirtilmiştir (Tablo 3). Uterus skoru 2 ve 3 olanlarda gruplar arasında gebelik oranlarında istatistiki bir fark bulunmuş (p<0.05), uterus skoru 1 ve 2 olan gruplar arasında ise istatistiki bir fark bulunmamıştır. Gebelik başına tohumlama sayısında da, uterus skoru 1 ve 2 olanlarda istatistiki fark bulunmuştur. Skor 1 ve 2 olanlarda oransal olarak skor 3 olanlara göre fark olmasına rağmen, istatistiki fark bulunmamıştır. Uterus boyutlarına göre değerlendirildiğinde ise, açık gün ortalamasında istatistiki fark bulunmamıştır. Tablo 4'de gruplara göre gebelik oranları, ilk tohumlama sağmal gün ortalaması, ilk tohumlama gebelik oranı, gebelik başına tohumlama sayısı, açık gün sayısı, ortalama sağmal gün sayısı ve 3 tohumlama sonrasında gebelik bulguları gibi fertilitte parametreleri gösterilmiştir. Gruplar arasında istatistiki fark bulunmamıştır (P>0.05).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Doğum sonrası bakteriyel kontaminasyon oluşan hayvanlarda postpartum ilk 3 haftalık süre içerisinde bakterilerin birçoğu elimine edilmektedir. Bu dönemde endometriyumun involüsyon süreci normal şekilde devam ediyorsa ilk 3 haftalık periyotta intrauterin tedavi

girişimleri gereksiz bulunmaktadır (LeBlanc ve ark. 2011). Ancak daha sonra ki günlerde devam eden enfeksiyonlarda ise enfeksiyon kaynağının hayvanın immun sistemi tarafından elimine edilebilme oranı %33 civarındadır (Sheldon ve ark. 2009). Postpartum vaginal akıntı skorlamasının bir sonra ki fertilitte ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Guliodori ve ark. (2017) postpartum 28. günden sonra yapılan vaginal akıntı skorlaması ve gebelik oranlarının birbiriyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Postpartum ilk 100 günde vaginal akıntı skoru 0 olanlarda gebelik oranının %51.1 (n=1615), vaginal akıntı skoru 1 olanlarda %40.7 (n=194), vaginal akıntı skoru 2 olanlarda %24.2 (n=136) şeklinde azaldığını bildirilmiştir (Guliodori ve ark. 2017). Araştırmacılar vaginal akıntı skorunun artmasının ilk tohumlama gebelik oranlarını azalttığını ve gebe kalma için gereken süreyi uzattığını belirtmektedirler. Bu çalışmada da vaginal akıntı skorlarıyla fertilitte parametrelerinin ilişkili olduğu görülmektedir. Akıntı skoru 1 olarak tespit edilen hayvanların gebelik başına tohumlama sayıları daha düşük olarak belirlenirken, akıntı skoru 2-3 olan hayvanlara göre ise aradaki farkın istatistiki olarak anlamlı olduğu görülmüştür (p<0.05). Vaginal akıntıda purulent partiküllerin görülmesinin seksüel siklusun başlamasını geciktirdiği (Mateus ve ark. 2002), progesteron üretimini azalttığı (Williams ve ark. 2007), uterus ortamını bozduğu (BonDurant 1999) ve embriyonik gelişimi olumsuz etkilediği ve fertilitteyi düşürdüğü (Knutti ve ark. 2000) belirtilmektedir. Baez ve ark. (2015) uterus boyutlarıyla gebelik başına tohumlama sayısının ilişkili olduğunu, uterus hacmi büyük olan ineklerin tohumlama / gebelik oranının yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada uterus skorlaması 1 ve 2 olan hayvanlarda gebelik başına tohumlama oranları arasında istatistiki olarak fark bulunmuştur (p<0.05). Uterus skoru 3 olan grupta, uterus skoru 1-2 olan gruba göre sayısal olarak gebelik başına tohumlama oranı yüksektir. Ancak istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu durumun örneklem sayısının az olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmacılar doğum öncesi vücut kondisyon skorunun postpartum endometritislerin kendiliğinden iyileşme oranını etkilediğini belirtmektedirler (Giuliodori ve ark. 2017). Doğum öncesi VKS 2.75- 3.25 arasında olan ineklerde kendiliğinden iyileşme oranı VKS 2.75' ten küçük veya 3.5 ten büyük olan ineklerdeki oranlardan daha yüksek bulunmuştur. Bu araştırmada doğum öncesi VKS bilinmediğinden böyle bir etkiyi gözlemlemek mümkün olmamıştır. Ancak postpartum VKS'nin 2.5 altına düşmemesi ve 2. muayene zamanında VKS artışının görülmesi şiddetli bir negatif enerji dengesi yaşanmadığını göstermektedir. Postpartum aşırı VKS kaybeden ineklerde metabolik profil ve immün baskılanmaya bağlı olarak endometritis olasılığının arttığı ve bununla düşük fertiliteye neden olduğu bildirilmektedir. Negatif enerji dengesinin sadece endometritis insidensini arttırmadığı aynı zamanda endometritisin iyileşme oranı üzerine de etkili olduğu bildirilmektedir (Giuliodori ve ark. 2017).

Okawa ve ark. (2017) postpartum uygulanan PGF2α tedavisinin korpus luteum varlığına bakılmaksızın %83.9 klinik iyileşme gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar PGF2α uygulamasından sonra vaginal akıntı durumuna bakarak yaptıkları endometritis teşhisinde insidensin önemli derecede azaldığını bildirmektedirler (LeBlanc ve ark. 2002). Bununla birlikte 35 ve 49. günlerdeki çift doz PGF2α tedavisinin sitolojik olarak teşhis edilen endometritislerde fertilitayı iyileştirmediği bildirilmektedir (Dubuc ve ark. 2011). Giuliodori ve ark. (2017) da purulent vaginal akıntı görülen ineklerde PGF2α uygulamasının fertiliteye olumlu bir etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Postpartum PGF2α uygulaması ile ilgili araştırmalarda çelişkili sonuçlar olduğu görülmektedir. Bazı vakalarda PGF2α tedavisinin etkisiz kalmasının nedeninin endometritisin şiddeti ile ilgili olabileceği belirtilmektedir. Sunulan araştırmada ilk doz PGF2α sonrasında vaginal akıntıda purulent partiküllerin azaldığı gözlenmiş fakat fark istatistiki olarak anlamsız bulunmuştur. Araştırmamızda tek başına PGF2α uygulaması yapılan gruplar, fertilité açısından intrauterin tedavi yapılan DMSO ve DO gruplarına benzer sonuçlar vermiştir. İntrauterin antibiyotik uygulamalarında kullanılan antibiyotik türüne göre sütte antibiyotik kalıntısı oluşmaktadır (Gorden ve ark. 2016). Antibiyotiklerin bu risklerinden dolayı PGF2α ile endometritis tedavisi önemli bir avantaj sağlamaktadır. İntrauterin uygulamaların iş gücü gerektirmesi ve inek açısından daha fazla stres oluşturması PGF2α uygulamasının bir diğer önemli avantajlarından birisidir. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Chlamydia pneumonia* gibi Gr (-) bakteriler kısıraklarda kronik endometritisin ana nedenleri arasında gösterilmektedir (Kristen ve ark. 2017). Kronik endometritise neden olan bu Gr (-) bakteriler biyofilm oluşturmak suretiyle uterusun savunma mekanizmalarından ve antibiyotiklerin etkisinden kaçabilmektedir. Özellikle mastitis, metritis, endometritis, pnemoni ve yara enfeksiyonlarında biyofilm oluşturan bakteriler saptanmıştır. Kısıraklarda DMSO, mukus, eksudat ve biyofilm gibi bariyerleri elemine etmesi özelliğinden dolayı klinik olgularda kullanılmaktadır. Kısırak endometriyumunda ülserasyona ve inflamatuvar hücre oluşumuna yol açmamasından dolayı %30'luk DMSO solüsyonu endometritis tedavisinde kullanılmaktadır. Kronik endometritis tedavisinde DMSO'nun etkilerinin kısmen kan dolaşımının artmasına neden olması, kısmen de dokularda anti-iskemik ve hipoksik koruyucu mekanizmalarla ilişkili olduğu bildirilmektedir (Ley ve ark. 1989). Kristen ve ark. (2017) %30 luk DMSO'nun *E. coli* ve *C. pneumonia* tarafından

oluşturulan biyofilmleri parçaladığını ve canlı bakteri sayısını azalttığını göstermiştir. Ayrıca kısıraklarda DMSO kullanımının anti-inflamatuvar etkisinden dolayı endometrijal histolojik yapıyı iyileştirdiği, intrauterin tedavide yardımcı tedavi olarak kullanılabilceği, endometritis tedavisinde kullanımının gebelik oranlarını iyileştirebileceği belirtilmektedir (Ley ve ark. 1989).

İneklerde endometritis tedavisi amacıyla DMSO'nun kullanımıyla ilgili az sayıda araştırmaya rastlanmıştır. Bu nedenle DMSO'nun inek endometriyumundaki etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ancak benzer bir etki mekanizmasıyla inek endometritislerinde de tedaviye katkı sağlama potansiyeli bulunmaktadır. Ahmedi ve ark. (2017) klinik endometritis belirtisi göstermeyen repeat breeder ineklerde endometriyumda biyofilm üreten bakteriler bulunduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar %10'luk DMSO solüsyonuyla uterus lavajı yapmanın biyofilm üreten bakteri sayısını yarı yarıya azalttığını göstermişlerdir. Bu azalışın nedeninin DMSO'nun mukolitik özelliği ve bakteriyel biyofilm oluşumunu engellemesi olduğu düşünülmektedir. Uterus içi antibiyotik uygulamasından önce DMSO ile uterus lavajı yapmanın antibiyotik etkinliğini arttırdığı bildirilmektedirler (Ley ve ark. 1989). Bu çalışmada antibiyotiklerle beraber DMSO'nun kullanımı diğer gruplara göre istatistiki açıdan önemli bir fark oluşturmadı. Uterus içi antibiyotik uygulamasını DMSO ile beraber yapmak yerine, antibiyotik uygulaması öncesinde DMSO ile uterus lavajı yapmanın endometritis tedavisinde daha iyi sonuçlar vermesi beklenebilir. Bu çalışmada DMSO'nun tek başına kullanıldığı grup gebelik açısından oransal olarak daha yüksek bulunmuştur. Antibiyotiklerin etkisini arttırmak amacıyla DMSO ve oksitetrasiklinin beraber kullanılması fertilité parametreleri açısından bir fark oluşturmadı. Bu durumun oksitetrasiklinin endometrijal iritasyona neden olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. İneklerde endometritis tanısı koyulmadan doğrudan postpartum tedaviye alınmaları endometritis bulunmayan ineklerin de intrauterin tedavi görmesine neden olmaktadır. Bu yüzden sağlıklı bir endometriyuma sahip olan ineklerde oksitetrasiklin tedavisi sonrasında kimyasal bir endometritis oluşması muhtemeldir. Bu kimyasal endometritis riski DO grubundaki düşük gebelik oranlarının nedenini açıklayabilir.

İneklerde endometritis tedavisinde intrauterin oksitetrasiklin uygulaması yaygın olarak kullanılmaktadır. Uterus içi antibiyotik uygulamalarında amaç bakterilerin tamamını elimine etmek değil, bakteri sayısını uterus savunma mekanizmasının baş edebileceği miktara düşürmektir. İntrauterin oksitetrasiklin uygulaması, endometriyum üzerinde doğrudan irrite edici etkiye neden olabilmekte, inflamatuvar yanıtı uyarmakta, uterus savunma reaksiyonları ve uterus lumeninde polimorfonükleer (PMN) lökosit infiltrasyonunu teşvik edebilmektedir. Ayrıca uterus dokularının rejenerasyonunu da sağlayabilmektedir (Cohen ve ark. 1995; Noakes ve ark. 2001). İntrauterin antibiyotik uygulamasında elde edilen tedavi etkisinin endometriyumdaki iritasyondan mı yoksa antibakteriyel etkiye bağlı olarak mı şekillendiği net olarak açıklık kazanmamıştır (Kaya 2008). İntrauterin oksitetrasiklin, paranteral PGF2α ve östradiolün endometritis tedavisinde kullanıldığı bir çalışmada, tedavi edilen tüm hayvanlarda genel başarı oranı %68 olarak bulunmuş, oksitetrasiklin kullanılanlarda %72, PGF2α kullanılanlarda %67, östrodiol kullanılanlarda ise %62 olarak bulunduğu belirtilmiştir. Oksitetrasiklinin östradiolden daha etkili sonuç verdiği

hafif endometritisli inekler hariç, tedavilerin başarı oranları arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (Sheldon ve Noakes 1988). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda intrauterin oksitetrasiklin kullanımının fertilité açısından daha başarılı olduğu bildirilmektedir (Sheldon ve Noakes 1988; LeBlanc ve ark. 2002). Ancak inek endometritislerinden yaygın olarak izole edilen *Truperalla pyogenes* gibi bakterilerin son yıllarda oksitetrasikline karşı giderek direnç kazandığı görülmektedir (Malinowski ve ark 2011; Zhang ve ark 2017). Bu çalışmada da intrauterin antibiyotik uygulaması, kontrol grubuna göre fertilité açısından önemli bir fark oluşturmamıştır. Benzer şekilde Cetin ve ark. (2018) oksitetrasiklin içeren rutin intrauterin antibiyotik uygulamasının gebelik oranı üzerine etkisinin, hiçbir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubundan farklı olmadığını bildirmiştir. Diğer taraftan oksitetrasiklin, intrauterin olarak uygulansa bile yüksek miktarlarda süte geçebildiği ve bunun metritisin derecesiyle de ilişkili olduğu bildirilmektedir (Gorden ve ark. 2016). Oksitetrasiklinin intrauterin uygulanmasından sonra 1-8 gün arasında süte kalıntıya neden olabileceği belirtilmektedir (Makki ve ark. 2016). Bu nedenle intrauterin oksitetrasiklin uygulanan inekler ayrı bir şekilde sağılacağı için çiftliklerde yönetsel sorunlar meydana gelmektedir. Antibiyotiklerin, süte kalıntı sorunu oluşturmaları da göz önüne alındığında (Gorden ve ark. 2016) intrauterin kullanımları bile giderek daha çok sorgulanmaktadır.

Çalışmada postpartum 15 gün arayla yapılan çift doz PGF2α tedavisinin fertilité açısından intrauterin tedaviler kadar olumlu sonuç verdiği belirlenmiştir. Postpartum birinci ve ikinci muayenede belirlenen vaginal akıntı ve uterus skorlarının da uygulanan tedavilere bakılmaksızın gelecek fertilité açısından önemli bilgiler sağladığı görülmüştür. İntrauterin DMSO uygulaması sonrası gebelik oranlarının diğer gruplardan daha yüksek olduğu gözlenmiş, fakat bu fark istatistiki açıdan önemli bulunmamıştır (P>0.05). İntrauterin antibiyotik uygulamasının yapıldığı grup ise fertilité parametreleri açısından oransal olarak daha düşük bulunmuştur.

1- Araştırmada DMSO'nun gebelik oranları üzerine etkisi istatistiki olarak ortaya koyulamadı. Ancak sayısal olarak olumlu bir fark mevcuttur. Sayıca arttırılmış bir popülasyonda DMSO uygulamasının fertilitéye olan etkisini daha net ortaya koyabileceği,

2- Postpartum vaginal akıntı skorlamasının gelecek fertilité açısından çok önemli bir parametre olabileceği,

3- Erken postpartum dönemde, rutin olarak intrauterin oksitetrasiklin uygulamasının fertilité parametrelerini olumlu etkilemediği,

4- İntrauterin oksitetrasiklin uygulamasının erken postpartum dönemde (25-35 gün), PGF2α ya da DMSO ya göre fertilité parametrelerinde fark sağlamaması, antibiyotik kalıntı problemi ve uygulama zorluğu düşünüldüğünde kullanımının tekrardan gözden geçirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

Ahmadi MR, Derakhshandeh A, Shirian S, Daneshbod Y, Ansari- Lari M, Nazifi S (2017). Detection of bacterial biofilm in uterine of repeat breeder dairy cows. *Asian Pac J Reprod*, 6 (3), 136-139.

- Armengol R, Fraile L (2015). Comparison of two treatment strategies for cows with metritis in high-risk lactating dairy cows. *Theriogenology*, 83 (8), 1344-51.
- Aslan S, Arbaiter K, Dickie MB (1995). İneklerde puerperal dönemde düzenli kontrollerin fertilité üzerinde ki etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 42, 307-315.
- Azawi OI (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *An Reprod Sci*, 105, 187-208.
- Baez GM, Barletta RV, Guenther JN, Gaska JM, Wiltbank MC (2015). Effect of uterine size on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology*, 85 (8), 1357-66.
- BonDurant RH (1999). Inflammation in the bovine female reproductive tract. *J Anim Sci*, 77,101-110.
- Cohen RO, Bernstein M, Ziv G (1995). Isolation and antimicrobial susceptibility of *Actinomyces pyogenes* recovered from the uterus of dairy cows with retained fetal membranes and post parturient endometritis. *Theriogenology*, 43, 1389-1397.
- Cetin Y, Ö Güngör, İ Taşal, C Sipahi, S Sendag, A Wehrend (2018). Effects of postpartum intrauterine treatments on reproductive performance of dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 53 (S1), 6.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, Leblanc SJ (2011). Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 94 (3), 1325-38.
- Giuliodori MJ, Magnasco M, Magnasco RP, Lacau-Mengido IM, Sota RL (2017). Purulent vaginal discharge in grazing dairy cows: Risk factors, reproductive performance, and prostaglandin F2α treatment. *J Dairy Sci*, 100 (5), 3805-3815.
- Gorden PJ, Ydstie JA, Kleinhenz MD, et al. (2016). A study to examine the relationship between metritis severity and depletion of oxytetracycline in plasma and milk after intrauterine infusion. *J Dairy Sci*, 99 (10), 8314-8322.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, et al. (2004). Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 62, 9-23.
- Kaya D (2008). İneklerde kronik endometritis olgularında lotogen®, eucacomp® ve PGF2α uygulamalarının fertilité parametreleri üzerindeki etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Knutti B, Busato A, Kuöpfer U (2000). Reproductive efficiency of cows with endometritis after treatment with intrauterine infusions or prostaglandin injections or no treatment. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 47 (10), 609-15.
- Kristen DL, Ryan AF, Patrick MM, Grace IB, Margo LH, Bradley RB (2017). In vitro biofilm disruption and bacterial killing using non-antibiotic compounds against gram-negative equine uterine pathogens. *J Equine Vet Sci*, 53, 94-99.
- Küplülü Ş, Vural R, Polat MI (2011). İneklerde uterus enfeksiyonlarının etiyopatogenezi, klinik semptomları ve sağaltım girişimleri. *Türkiye Klinikleri*, 2(1), 58-65.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, et al. (2002). The effect of treatment of clinical endometritis on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci*, 85 (9), 2237-49.
- LeBlanc SJ, Osawa T, Dubuc J (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 76 (9), 1610-8.
- Ley WB, Bowen JM, Sponenberg DP, Lessard PN (1989). Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology*, 32 (2), 263-76.
- Makki M, Gheisari HR, Ahmadi MR (2016). Effect of different intrauterine oxytetracycline Treatment on reproductive performance of dairy cows with clinical endometritis and determination of oxytetracycline residues in milk. *Istanbul Üniv Vet Fak Derg*, 42 (1), 80-88.
- Malinowski E, Lessa H, Markiewicz H, Kaptur M, Nadolny M, Niewitecki W (2011). Sensitivity to antibiotics of *Arcanobacterium pyogenes* and *Escherichia coli* from the uteri of cows with metritis/endometritis. *Vet J*, 187, 234-38.
- Mateus L, da Costa, F, Bernardo F, Silva JR (2002). Influence of puerperal uterine infection on uterine involution and postpartum ovarian activity in dairy cows. *Reprod Domest Anim*, 37, 31-35.
- Noakes DE, Parkinson TJ, England GCV (2001). *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics*. 8th Edition, WB Saunders London.
- Okawa H, Fujikura A, Wijayagunawardane MMP, Taniguchi M, Takagi M (2017). Effect of diagnosis and treatment of clinical endometritis based on vaginal discharge score grading system in postpartum Holstein cows. *J Vet Med Sci*, 79 (9), 1545-1551.
- Pascotini OB, Hostens M, Dini P, Vandepitte J, Ducatelle R, Opsomer G (2016). Comparison between cytology and histopathology to evaluate subclinical endometritis in dairy cows. *Theriogenology*, 86, 1550-1556.

- Sheldon IM, Brice SB, Cronin J, Gilbert RO, Gadsby JE (2009).** Mechanisms of infertility associated with clinical and subclinical endometritis in high producing dairy cattle. *Reprod Dom Anim*, 44 (Suppl. 3), 1-9.
- Sheldon IM, Lewis GS, LeBlanc S, Gilbert RO (2006).** Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology*, 65 (8), 1516-30.
- Sheldon IM, Noakes DE (1988).** Comparison of three treatments for bovine endometritis. *Vet Rec*, 142 (21), 575-9.
- Wexler P (2005).** Dimethyl Sulfoxide (DMSO) In: Encyclopedia of Toxicology 2nd Edition, Gad SE, Sullivan DW Ed(s), 166-168, Elsevier, USA.
- Williams EJ, Fischer DP, Noakes DE, et al. (2007).** The Relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology*, 68, 549-559.
- Zhang D, Zhao J, Wang Q, et al. (2017).** *Trueperella pyogenes* isolated from dairy cows with endometritis in Inner Mongolia, China: Tetracycline susceptibility and tetracycline-resistance gene distribution. *Microb Pathog*, 105, 51-56.



The Effect of Dietary Supplemental Levels of Rosehip Fruit on Egg Yield and Characteristics and Live Weight Change and Feed Conversion Ratio of Cold Stressed Laying Hen Diet

Serhat YILDIZ¹  Ahmet TEKELİ²  Murat DEMİREL²  Reşit ALDEMİR¹ 
İ. Hakkı YÖRÜK³  Saadet BELHAN⁴  Volkan KOŞAL⁴ 

¹ Van Yuzuncu Yil University, Gevaş Vocational School, Department of Veterinary Program, Van, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Van, Turkey

³ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Van, Turkey

⁴ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Van, Turkey

Received: 07.07.2019

Accepted: 31.05.2020

ABSTRACT

In this study, synthetic ascorbic acid (100 mg/kg) or different doses of rosehip fruit (5, 10 and 15 g/kg) as a source of ascorbic acid were added to the rations of Nick Brown laying hens grown under cold stress and the effects of these supplements on laying performance, egg quality, egg yolk color values, live weight changes, rectal temperature, feed consumption and feed conversion ratio were investigated. 120 Nick Brown laying hens at the ages of 24 weeks were used and feed and water were provided ad libitum. During the 12 weeks of trial, a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of dark was applied, and the temperature was set at 24°C for 12 hours, 14°C for 12 hours to induce cold stress. It was observed that egg weight, egg white weight and shell weight, as well as feed conversion ratio, decreased in all supplementation groups in comparison to the control group, while yolk weight, Roch color scale and feed conversation ratio increased in all supplementation groups in comparison to the control group, and the egg yolk index, egg white index and Haugh unit values were found to be lower in the group that received 10 g/kg of rosehip fruits supplement than in the other groups. It was determined that in terms of laying performance, weekly number of eggs, egg yield, total egg weight and values of egg yolk and redness were numerically higher in the group that was given 15 g/kg of rosehip fruits in comparison to all other groups, but the supplements did not change the rectal temperature values.

Keywords: Laying hen, Rosehip fruit, Ascorbic acid, Egg quality, Feed conversion

ÖZ

Soğuk Stresi Altında Yetiştirilen Yumurtacı Tavukların Rasyonlarına Farklı Düzeylerde Katılan Kuşburnu Meyvesinin Yumurta Verimi ve Özellikleri ile Canlı Ağırlık Değişimi ve Yemden Yararlanma Üzerine Etkisi

Soğuk stresi altında yetiştirilen Nick Brown yumurtacı tavuk rasyonlarına sentetik askorbik asit (100 mg/kg) veya askorbik asit kaynağı olarak farklı dozlarda (5, 10 ve 15 g/kg) kuşburnu meyvesi katılmasının yumurtlama performansı, yumurta kalitesi, yumurta sarısı renk değerleri, canlı ağırlık değişimleri, rektal sıcaklık ve yem tüketimleri ile yemden yararlanma oranları üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada 24 haftalık yaştaki 120 adet kahverengi yumurtacı Nick Brown tavuklar kullanılmış, yem ve su serbest olarak verilmiştir. 12 haftalık deneme süresince 16 saat aydınlık; 8 saat karanlık aydınlatma programı uygulanmış, deneme ünitesinde sıcaklık 12 saat süreyle 24 °C, soğuk stresi oluşturmak amacıyla da 12 saat süreyle 14 °C olarak ayarlanmıştır. Yumurta ağırlığı, ak ağırlığı ve kabuk ağırlığı ile yemden yararlanma değerleri tüm katkı gruplarında kontrol grubuna göre azaldığı, sarı ağırlığı ve Roch renk skala değeri ile yemden yararlanma oranı değerleri tüm katkı gruplarında kontrol grubuna göre arttığı, yumurta sarı indeksi, yumurta ak indeksi ve Haugh birimi değerlerinin 10 g/kg kuşburnu katılan grupta diğer katkı gruplarından düşük olduğu tespit edilmiştir. Yumurtlama performansı olarak, haftalık yumurta sayısı, yumurta verimi ve toplam yumurta ağırlığı ile yumurta sarısı ve kırmızılığı değerleri, rasyonlara 15 g/kg düzeyinde kuşburnu meyvesinin katılması durumunda sayısal olarak diğer tüm gruplardan daha yüksek değerde olduğu, katkıların rektal sıcaklık değerlerini değiştirmediği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Yumurta tavuğu, Kuşburnu meyvesi, Askorbik asit, Yumurta kalitesi, Yemden yararlanma



GİRİŞ

Hayvan beslemede alanındaki yem katkı maddelerinin kullanımında belirli kurallara uyulması gereklidir. Bununla ilgili bazı düzenlemeler yapılmıştır. Buna göre yem katkı maddeleri; insan sağlığı, hayvan sağlığı veya çevre üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmamalı, kullanıcıyı yanıltıcı şekilde sunulmamalı, hayvansal ürünlerin belirli özelliklerini bozarak tüketiciye zarar vermemeli ya da bu özellikler ile ilgili olarak tüketiciyi yanıltıcı olmamalıdır (Anonim 1). Avrupa Parlamentosu ve konsey tüzüğü (EC) 1831/2003, yem katkı maddeleri ile ilgili 70/524/EEC konsey direktifi ile CoE 403 numaralı Rosa canina bitkisini doğal ürün olarak tanımlanmış ve yem katkı maddesi olarak kabul etmişlerdir (Anonim 2). Rosa canina meyveleri, soğuk algınlığı, nezle, hafif enfeksiyon hastalıkları, halsizlik, hazımsızlık ve gastrit tedavisinde kullanılmaktadır (Bown 1996). Kuşburnu meyvesinin sağlık açısından önemi zengin vitamin ve minerallerinin yanı sıra bioflavonoidler ve karotenoidler (likopen, zeta-karoten, beta-karoten, ksantofil, neoksantin ve lutein) içeriğinden ileri gelmektedir (Çınar ve ark. 2004). Kuşburnunun en önemli bileşenlerinden biri olan askorbik asitin (C vitamini) miktarı, türler arasında büyük bir varyasyon göstermekte olup Türkiye’de yapılan araştırmalarda bu değer 417.3-3062 mg/100g arasında değiştiği bildirilmiştir (Çelik 2005). Konya’da yetişen kuşburnu meyvesinde C vitamini miktarı 2365 mg/100g olarak tespit edilmişken bu rakam Kastomonu’da 2712 mg/100g’a olarak bulunmuştur. Bu farklılık, mevcut çalışmada kullanılan kuşburnu meyvesinin yetiştiği bölgenin yüksek rakımına ve güneşli gün sayının daha fazla olmasına atfedilebilir. C vitamininin en büyük özelliği vücudumuzda oluşan serbest radikalleri yok etmesidir (Saraçoğlu 2006) ve bu özelliğinin yanı sıra anti stres faktör olarak kanatlı rasyonlarında kullanılmaktadır (Njoku 1986; Kutlu ve Forbes 1993). Sonbaharda besiye alınan hindilerde askorbik asit (0, 50, 100, 150 mg/kg) uygulamasının besi performansı üzerine olumlu bir etkisi olmadığı bildirilmiş, soğuk stresini önlemede askorbik asidin etkisinin daha belirgin olarak ortaya konulabilmesi için daha yüksek dozlarda ve daha soğuk bölgelerde çalışmaların yapılması önerilmiştir (Değirmencioğlu ve Ak 2003). Kanatlı yetiştiriciliğinde ekonomik bir üretimin yapılabilmesi için stres faktörlerinin önlenmesi gerekmektedir. Çünkü stres durumunda verim için kullanılacak besin maddelerinin bir bölümü yaşamı devam ettirebilmek için harcanmakta bu da hayvanın sağlığını ve verimini olumsuz yönde etkilemektedir. Kanatlı kümes hayvanları diğer çiftlik hayvanlarına oranla stres faktörlerine karşı daha duyarlı olup, ortamın sıcaklığı önemli bir stres faktörü olarak hayvanların sağlığını ve verimini olumsuz yönde etkilemektedir (Alves ve ark. 2012; Lara ve Rostagno 2013) Dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi Türkiye’de de kanatlı üretimi, ısı stresinden olumsuz etkilenmektedir. Kuşburnu, tüm meyve ve sebzeler arasında en yüksek C vitamini varlığına sahip olması ve antioksidan aktiviteye sahip karoten içeriği ile dikkat çekmektedir (Ağaoğlu 1987; Erge 2007; Duru 2008). Antioksidan kapasitenin koruyucu gücünün aşıldığı stres koşulları altında, oksidatif stresin hasar oluşturan etkileri ortaya çıkmaktadır (Manisha ve ark. 2017). Hayvanlar üzerinde yapılan denemelerle kuşburnu tohumlarının kolesterol ve trigliserid oranını düşürdüğü belirlenmiş, bu nedenle kuşburnunun diyetik insan gıdalarında bir bileşen olarak kullanılabilmesinin uygun olacağı kanaatine varılmıştır (Kadalkal ve Nas 2004). Bu nedenle soğuk stresine bağlı olarak gelişecek oksidatif stresin kuşburnu ile azaltılabileceği, karaciğerde kolesterol

sentezinde rol oynayan enzimleri inhibe ederek ve LDL reseptörlerinin aktivitesini artırarak plazma kolesterol konsantrasyonunun kuşburnu ile düşürülebileceği ümit edilmektedir.

Ayrıca, stress koşullarında glikokortikoidlerin sürekli salınımına bağlı olarak gelişen protein yıkımı, yağlanmanın artması ve hiperglisemi gibi metabolik bozuklukların kuşburnu ile önlenilebileceği ve buna bağlı olarak gelişecek olan ölüm kayıplarının da kuşburnu ile azaltılacağı ümit edilmektedir. Bu deneme sonucunda, soğuk stresine maruz kalan yumurtacı tavuklarda; C vitamini ihtiyacını karşılamak amacıyla ticari askorbik asit yerine, doğal kuşburnu meyvesinin uygun kullanım düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca, yumurta verimi kayıplarının önlenmesi, yemden yararlanma oranının artırılması, yumurta karoten içeriği ve raf ömrü artırılması ile fonksiyonel ürün elde edilebileceği kanısı oluşmuştur.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Çiftlik Müdürlüğü kümesinde 24 haftalık yaşta 120 adet kahverengi yumurtacı Nick Brown tavukları ile yürütülmüştür. Çalışmada yumurta kalite kriterleri ile yumurta ve yem analizleri için Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Laboratuvar olanaklarından yararlanılmıştır. Denemede kullanılan rasyonlara ait değerler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. Denemede kullanılan rasyonlara ait değerler

Table 1. Compositions of the diets

Hammaddeler	Oran (g/kg)	Analiz Edilen Besin Maddeleri	(%)
Mısır	55.630	Kuru Madde	89.62
Yemlik Un (46-52)	15.000	Ham Protein	16.75
Soya Küspesi (44)	10.967	Ham Selüloz	3.17
Fullfat Soya	6.346	Ham Yağ	3.71
Mermer Tozu (Grn)	6.326	Ham Kül	10.68
Ayçiçeği Küspesi (34)	3.032	Nişasta	44.96
DCP 18	1.636	Me-Pou	11.72
Tuz	0.244	Me-Pou	2.80
Sodyum Bi Karbonat	0.190	Tot-P	0.61
D-L Metiyonin	0.170	Na	0.16
Damızlık Vitamini ¹	0.200	K	0.62
Damızlık Minerali ²	0.100	Cl	0.22
Choline-60	0.060		
L- Threonine	0.053		
L-Lysine	0.050		

¹: Her 2 kg’lık karışımda 12 500 000 IU Vitamin A, 3 000 000 IU Vitamin D3, 80 000 mg Vitamin E, 5000 mg Vitamin K3, 3000 mg Vitamin B1, 12000 mg Vitamin B2, 55000 mg Niasin, 15000 mg Ca-D-Pantothenate, 4000 mg Vitamin B6, 40 mg Vitamin B12, 2000 mg Folik Asit, 250 mg D-Biotin

2:Her 1 kg'lık 120000 mg Manganez, 60000 mg Demir, 100000 mg Çinko, 10000 mg Bakır, 500 mg Kobalt, 2000 mg İyot, 200 mg Selenyum.

Denemede 5 grup oluşturulmuştur. Her bir grup, ortalama canlı ağırlıkları benzer ve her birinde 8 adet tavuk bulunan 3 alt gruba ayrılarak kafeslere yerleştirilmiştir. Her bir grup 2850 ME (kcal/kg), %16,75 HP içeren yumurtacı damızlıklar için hazırlanan bazal rasyonla beslenmişlerdir. Hiçbir katkının ilave edilmediği grup kontrol grubunu oluştururken, askorbik asit ve farklı dozlarda kuşburnu meyvesinin katıldığı gruplar muamele gruplarını oluşturmuştur. Denemede oluşturulan gruplar Tablo 2'de verilmiştir. Tesadüfi olarak kafeslere yerleştirilen tavuklara yem ve su serbest olarak verilmiştir. 12 haftalık deneme süresince 16 saat aydınlık; 8 saat karanlık aydınlatma programı uygulanmış, deneme ünitesinde sıcaklık 12 saat süreyle 24 °C, soğuk stresi oluşturmak amacıyla da 12 saat süreyle 14 °C olarak ayarlanmıştır.

Tablo 2. Denemede ki gruplar

Table 2. The groups in trial

Grup	Kontrol Grubu	Katkı yok
1. Grup	Kontrol Grubu	Katkı yok
2. Grup	Askorbik Asit (Vitamin C) Grubu	100 mg/kg Vitamin C
3. Grup	Kuşburnu 1	5 g/kg
4. Grup	Kuşburnu 2	10 g/kg
5. Grup	Kuşburnu 3	15 g/kg

Deneme başı ve deneme sonu itibariyle hayvanların canlı ağırlıkları ve buna göre de canlı ağırlık artışları belirlenmiştir. Yumurta verimleri günlük, yem tüketimleri ve yumurta ağırlıkları ise haftalık olarak ölçülmüştür. Bunlardan yararlanarak yemden yararlanma düzeyi hesaplanmıştır. Yemden yararlanma düzeyi haftalık yem tüketiminin (g) haftalık yumurta verimine (g) bölünmesi ile elde edilmiştir. Çalışmanın başlangıcı dahil 2 haftada bir olmak üzere toplam 7 kez yumurta kalite parametreleri [şekil indeksi, sarı indeksi, ak indeksi, Haugh birimi, kabuk kalınlığı, sarı rengi (Roche renk skalası), Minolta marka renk ölçer ile yumurta sarısının L, A, B, C ve H değerleri], her gruptan alınan rastgele 20 yumurtada ölçülmüştür. Yumurta kalitesinin belirlenmesi amacıyla her gruptan bir günlük tüm yumurtalar toplanıp tek tek numaralandırılarak oda sıcaklığında bir gün bekletildikten sonra analiz edilmiştir. Yumurtanın eni ve uzunluğu dijital kumpas ile ölçülmüştür. Bu değerlerden yararlanılarak şekil indeksi değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır

Yumurta eni (cm)

Şekil indeksi (%) = $\frac{\text{Yumurta eni (cm)}}{\text{Yumurta boyu (cm)}} \times 100$

Yumurta boyu (cm)

Ağırlıkları belirlenen yumurtalar mermer bir tezgâha kırılmıştır. Kırılan yumurtalarda sarı ve ak yüksekliği mikrometre, sarı çapı, ak uzunluğu ve ak genişliği ise kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Bu değerlerden yararlanılarak sarı indeksi, ak indeksi ve Haugh birimi formülleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Kırılan yumurta

sarısının yüksekliği (mm)

Sarı indeksi (%) = $\frac{\text{Kırılan yumurta sarısının yüksekliği (mm)}}{\text{Kırılan yumurta sarısı çapı (mm)}} \times 100$

Kırılan yumurta

sarısı çapı (mm)

Kırılan yumurta

akının yüksekliği (mm)

Ak indeksi (%) = $\frac{\text{Kırılan yum. uzunluk} + \text{genişlik}}{2} \times 100$

(Kırılan yum. uzunluk + genişlik)/2

Haugh Birimi = $100 \cdot \log(H + 7.57 - 1.7W^{0.37})$

H: Yumurta akı yüksekliği, mm

W: Yumurta ağırlığı, g

Ak ağırlığı (g) = [Yumurta ağırlığı - (sarı ağırlığı + kabuk ağırlığı)]

Sarı oranı (%) = $\frac{\text{Sarı ağırlığı}}{\text{yumurta ağırlığı}} \times 100$

Ak oranı (%) = $\frac{\text{Ak ağırlığı}}{\text{yumurta ağırlığı}} \times 100$

Kabuk oranı (%) = $\frac{\text{Kabuk ağırlığı}}{\text{yumurta ağırlığı}} \times 100$

Haftalık olarak tüketilen yem miktarının, o haftaya ait toplam yumurta verimine bölünerek, yemden yararlanma oranları belirlenmiştir.

Yem Tüketimi (gr)

Yemden Yararlanma Oranı = $\frac{\text{Yem Tüketimi (gr)}}{\text{Yumurta Verimi (gr)}}$

Yumurta Verimi (gr)

Kırılan yumurtaların sivri, küt ve orta kısımlarından alınan kabuk örneklerinde kabuk zarları çıkarılarak mikrometre ile ölçüm yapılmıştır.

Çalışmanın deneme düzeni tesadüf parselleri deneme desenine (Düzgüneş ve ark. 1987) göre düzenlenmiş ve istatistiksel analizler SAS paket programı kullanılarak yapılmıştır (SAS 2014).

Kuşburnu C vitamini analizi

C vitamini analizi HPLC cihazında C18 kolonda (Phenomenex Luna C18, 250 x 4.60 mm, 5 µ) gerçekleştirilmiştir. Kolon fırını sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır. Sistemde mobil faz olarak 1 ml/dakika akış hızında pH düzeyi H2SO4 ile 2.2'e ayarlanmış ultra saf su kullanılmıştır. Okumalar DAD dedektörde 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. C vitamini pikinin tanımlanması ve miktarının belirlenmesinde farklı konsantrasyonlarda (50, 100, 500, 1000, 2000 ppm) hazırlanan L-askorbik asit (Sigma A5960) kullanılmıştır (Cemeroğlu 2007). Elde edilen verilerin hesaplanması ile denemede kullanılan kuşburnu meyvesinin vitamin C içeriği 100 g'da 2862.66 mg olarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Soğuk stresine maruz bırakılan yumurtacı tavuklarda karma yemlere askorbik asit ve farklı miktarlarda kuşburnu meyvesi katılmasının canlı ağırlık ve canlı ağırlık değişimleri üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Tablo 3). Ancak deneme sonu canlı ağırlık değerlerinin tüm gruplarda, başlangıç değerlerine göre bir miktar düşmesi yumurtacı tavuklarda hayvanların günlük yumurta vermeye devam etmesi ile birlikte uygulanan soğuk stresi uygulanması bağlanabilir. Yapılan bir çalışmada, broylerlerin rasyonlarına, 0, 10, 20, ve 30 g/kg kuşburnu katılmış ve 10 ve 20 g/kg kuşburnu ilavesinin canlı ağırlığı artırdığını ancak 30 g/kg düzeyinde ilavesinin ise canlı ağırlık artışında azalmaya sebep olduğunu bildirmiştir (Tekeli 2014). Yapılan başka bir çalışmada ise, yumurtacı tavukların rasyonlarına %0, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 düzeylerinde kuşburnu ile sentetik sarı renk maddesi

katılmıştır. Çalışmada kullanılan tavukların deneme başı ve sonu CA değerlerinde önemli bir farklılık gözlenmediği ancak canlı ağırlık değişimi bakımından farklılıklar istatistiki olarak önemli ($P<0.01$) bulunduğu, ayrıca %8 kuşburnu grubunda CA kaybının rakamsal olarak diğer gruplardan daha fazla olduğu bildirilmektedir (Arpat 2016). Rasyona antibiyotik, vitamin E, 100 mg biberiye, 200 mg biberiye, 300 mg biberiye katılmasının final canlı ağırlıkları ve canlı ağırlık artışları bakımından gruplar arasında farklılık önemli bulunmadığı bildirilmektedir (Çimrin ve Demirel 2016). Esenbuga ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, kuzu rasyonlarına %15 kuşburnu çekirdeği ilavesinin CA kaybına neden olduğunu ve bunun sebebinin selülozun yükselmesine bağlı yemin enerji yoğunluğunun azalması olabileceğini bildirmişlerdir.

Deneme sonucunda yumurta ağırlığının 2, 3 ve 5. Gruplarda kontrole göre daha düşük olduğu, sarı ağırlığının 3 ve 4. Gruplarda kontrole göre daha yüksek olduğu, ak ağırlığı ve yumurta eninin ise katkı yapılan gruplarda kontrole göre azaldığı tespit edilmiştir. (Tablo 4). Ortalama yumurta ağırlığında düşüş meydana gelmesi bu gruplarda rakamsal olarak yem tüketimlerinin ve yemden yararlanmalarının kötüleşmesine bağlanabilir. Yumurta sayısı ve toplam yumurta ağırlığındaki değişimler üzerine askorbik asit ve kuşburnu katkılarının önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Arpat (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, yumurta ağırlığı bakımından gruplar arasındaki farklılıklar 1.dönem hariç diğer dönemlerde önemli ($P<0.05$) bulunmakla birlikte, ortalama değerlere bakıldığında ise en yüksek değer %0.5 kuşburnu grubunda ve en düşük değer ise sentetik renk maddesi grubunda olduğu ($P<0.05$) bildirilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise, yumurtacı tavukların rasyonlarında 225 ppm tatlı kuru yeşilbiber tozu ilavesinin yumurta ağırlığını azalttığı, ak yüksekliği, yumurta sarısı ağırlığı, ak ağırlığı değerlerinin ilave edilen biber tozundan etkilenmediğini bildirmişlerdir (Rossi ve ark. 2015). 10 g/kg kuşburnu meyvesi ilavesinin ak indeksini ve Haugh birimini kontrol grubuna kıyasla düşürdüğü ve farklı dozlarda kuşburnu meyvesi ilavesi Roch renk skala değeri artırdığı ($P<0.05$) görülmüştür. Yumurta sarısı Roch renk skala değerindeki önemli düzeyde görülen artış kuşburnu meyvesinin bioflavonoidler ve karotenoidler (likopen, zeta-karoten,

beta-karoten, ksantofil, neoksantin ve lutein) içeriğinden ileri geldiği düşünülmektedir (Çınar ve ark., 2004). Yumurtacı tavuk yemlerine farklı dozlarda biberiye uçucu yağı ilavelerinin performans, yumurta kalite kriterleri ve yumurta sarısı lipit oksidasyonu üzerine etkisi araştırıldığı çalışmada, rasyon grupları kontrol, antibiyotik, vitamin E, 100, 200 ve 300 mg biberiye içerecek şekilde hazırlanmıştır. Buna sarı indeksi, ak indeksi ve Haugh birimi bakımından gruplar arasında farklılıklar önemli bulunmadığı ($P>0.05$) bildirilmektedir (Çimrin ve Demirel 2016). Çalışmada, kabuk ağırlığı, kabuk kalınlığı, şekil indeksi üzerine katkıların etkisinin olmadığı görülmüştür (Tablo 4). Bu durum, kullanılan askorbik asit ve kuşburnu meyvesinin Ca metabolizması üzerine bir etkisinin olmamasına bağlanabilir. Kabuk ağırlığı, kabuk kalınlığı ve kabuk oranı gibi kabuğa ait özellikler bütün periyotlar boyunca katkılardan önemli düzeyde etkilendiğini bildiren çalışmaların yanında (Shit ve ark. 2012; Arpat 2016), kabuk ağırlığı, kabuk kalınlığı, şekil indeksi, gibi kabuğa ait özelliklerin katkılardan etkilenmediğini bildiren (Shalaei ve ark. 2014; Çimrin ve Demirel 2016) çalışmalar da mevcuttur. Soğuk stresine maruz bırakılan yumurtacı tavuk karma yemlerine askorbik asit ve farklı miktarlarda kuşburnu meyvesi katılmasının yumurta sayısı, yumurta verimi, toplam yumurta ağırlığı üzerine katkıların etkisinin istatistiksel olarak olmadığı ($P>0.05$) görülmektedir. Ayrıca 10 mg ve 15 mg/kg kuşburnu ilave edilen gruplarda sayısal olarak bir artışın olduğu belirlenmiştir (Tablo 5). Yapılan bir çalışmada Venda tavuklarının rasyonlarına farklı düzeylerde katılan askorbik asitin, tavukların verimliliği, yumurta verimi ve ağırlığı üzerindeki etkileri incelenmiş ve askorbik asit katkısının tüm gruplarda yumurta sayısına ve ağırlığına etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Adesola ve ark 2013). Cayan ve Erenner (2015) ise yaptıkları çalışmada, zeytin yaprağı tozunun yumurta tavuklarında yumurta kalitesi, yumurta ağırlığı ve yumurta verimini artırdığını bildirmişlerdir. Yemden yararlanma oranı ve yem tüketimi üzerine katkıların etkisinin istatistiksel olarak olmadığı ($P>0.05$) görülmele birlikte, yemden yararlanma oranı bakımından tüm gruplarda sayısal olarak kontrol grubuna göre bir artış, yem tüketiminde de bir düşüşün olduğu görülmektedir (Tablo 5).

Tablo 3. Rasyona Vitamin C ya da Kuşburnu Meyvesi Katılmasının Yumurtacı Tavuklarda C.A.D Üzerine Etkisi
Table 3. The Effect on Live Weight Levels in Laying Hens of Vitamin C or Rosehip Fruit Supplementation

Parametreler	Deneme Grupları					SEM	P Değeri
	1. Grup (Kontrol)	2. Grup (Ticari askorbik asit)	3. Grup (5g/kg Kuşburnu)	4. Grup (10g/kg Kuşburnu)	5. Grup (15g/kg Kuşburnu)		
Deneme başı canlı ağırlıkları (g/tavuk)	1812.21	1812.67	1800.42	1817.33	1764.75	0.0438	0.7359
Deneme sonu canlı ağırlıkları (g/tavuk)	1783.53	1737.89	1717.10	1659.50	1692.60	0.0225	0.4645
Canlı ağırlık kazancı (g/tavuk)	-28.68	-74.78	-83.32	-157.73	-72.15	19.8488	0.1961

SEM: Ortalamalar arası farkın standart hatası (Standart error of difference between means); C.A.D: Canlı Ağırlık Değeri

Tablo 4. Rasyona Vitamin C ya da Kuşburnu Meyvesi Katılmasının Yumurta Kalitesi Üzerine Etkisi**Table 4.** Effect on Egg Quality of Vitamin C or Rosehip Fruit Supplementation

Parametreler	Deneme Grupları					SEM	Önem Düzeyi (=P)
	1. Grup (Kontrol)	2. Grup (Ticari Askorbik Asit)	3. Grup (5g/kg Kuşburnu)	4. Grup (10g/kg Kuşburnu)	5. Grup (15g/kg Kuşburnu)		
Yumurta ağırlığı (g/yumurta)	64.58a	62.02b	62.77b	63.32ab	62.98b	0.2330	0.0113
Sarı ağırlığı (g/yumurta)	14.65b	14.86ab	15.23a	15.20a	14.89ab	0.0647	0.0248
Ak ağırlığı (g/yumurta)	43.12a	40.70b	41.00b	41.66b	41.41b	0.1825	0.0003
Kabuk ağırlığı (g/yumurta)	6.80	6.57	6.61	6.58	6.71	0.0298	0.0719
Yumurtanın eni (mm)	44.94a	44.36b	44.54b	44.54b	44.61b	0.0028	0.0129
Yumurtanın boyu (mm)	56.52a	55.76b	56.16ab	56.42a	55.97ab	0.0819	0.0204
Şekil indeksi (%)	79.58	79.61	78.75	79.02	79.74	0.1589	0.2070
Yumurta sarı indeksi	46.50ab	46.88a	46.16ab	45.11c	45.80bc	0.1499	0.0022
Ak indeksi	9.97a	10.50a	10.50a	9.10b	10.39a	0.1141	0.0002
Haugh birimi	87.16a	88.30a	87.17a	83.63b	87.40a	0.3725	0.0009
Kabuk kalınlığı (µm)	0.35	0.35	0.35	0.35	0.36	0.0013	0.5092
Roch Skala	8.50b	8.38b	9.74a	9.56a	9.72a	0.0879	<.0001

SEM: Ortalamalar arası farkın standart hatası (Standart error of difference between means)

*: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen grup ortalaması arasındaki farklılık istatistik olarak önemlidir (P<0.05).

Tablo 5. Rasyona Vitamin C ya da Kuşburnu Meyvesi Katılmasının Performans Üzerine Etkisi**Table 5.** Effect on Performance of Dietary Vitamin C or Rosehip Fruit Supplementation

Parametreler	Deneme Grupları					SEM	Önem Düzeyi (=P)
	1. Grup (Kontrol)	2. Grup (Ticari Askorbik Asit)	3. Grup (5g/kg Kuşburnu)	4. Grup (10g/kg Kuşburnu)	5. Grup (15g/kg Kuşburnu)		
Yumurta sayısı (tavuk/hafta)	5.90	5.83	5.81	5.94	6.02	0.0025	0.6505
Yumurta verimi (%)	83.92	83.23	83.03	84.78	86.02	0.7094	0.6495
Ortalama yumurta ağırlığı, (g/yum./hafta)	64.19a	60.66b	61.43b	61.62b	61.53b	0.2568	0.0003
Toplam yumurta ağırlığı, (g/hafta)	2721.63	2740.41	2626.04	2765.97	2905.80	37.4733	0.2063
Yemden yararlanma oranı	1.86	1.94	1.90	1.87	1.87	0.0239	0.8170
Yem tüketimi (g/gün)	100.21	97.31	95.56	96.93	98.18	1.2192	0.8020

Tablo 6. Rasyona Vitamin C ya da Kuşburnu Meyvesinin Katılmasının Yumurta Sarısı Renk Değerleri Üzerine Etkisi**Table 6.** Effect on Egg Yolk Color Parameters of Vitamin C or Rosehip Fruit Supplementatation

Parametreler	Deneme Grupları					SEM	P Değeri
	1. Grup (Kontrol)	2. Grup (Ticari askorbik asit)	3. Grup (5g/kg Kuşburnu)	4. Grup (10g/kg Kuşburnu)	5. Grup (15g/kg Kuşburnu)		
L* (Parlaklık)	61.46	62.15	61.96	62.12	62.36	0.1282	0.2212
C* (Chroma, Rengin Doygunluğu)	54.74c	57.41ab	57.25b	58.67ab	59.18a	0.2760	<.0001
H* (Hue, Renk Açısı)	86.25b	87.31a	86.71ab	85.92b	85.82b	0.1331	0.0011
a* (Kırmızılık)	3.88	3.54	3.95	4.38	4.44	0.1199	0.0787
b* (Sarılık)	54.60b	57.21a	57.18a	58.48a	58.99a	0.2732	<.0001

SEM: Ortalamalar arası farkın standart hatası (Standart error of difference between means)

*: Aynı satırda farklı harflerle gösterilen grup ortalaması arasındaki farklılık istatistik olarak önemlidir (P<0.05).

Tablo 7. Rasyona Vitamin C ya da Kuşburnu Meyvesi Dozlarının Katılmasının Yum. Tavuk. Rek. Sıc. Değ. Üzerine Etkisi**Table 7.** Effect on Rectal Temperature in Laying Hens of Vitamin C or Rosehip Fruit Supplementatation

Parametreler	Deneme Grupları					SEM	P Değeri
	1. Grup (Kontrol)	2. Grup (Ticari Askorbik asit)	3. Grup (5g/kg Kuşburnu)	4. Grup (10g/kg Kuşburnu)	5. Grup (15g/kg Kuşburnu)		
Stres Öncesi Sıcaklık (°C)	41.32	41.36	41.21	41.29	41.41	0.0231	0.0578
Stres Sonrası Sıcaklık (°C)	40.96	41.01	40.93	41.07	41.12	0.0305	0.2677

Tekeli (2014) broyler rasyonlarına 0, 10, 20 ve 30 g/kg kuşburnu meyvesi kattığı çalışması sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığını, sayısal olarak en yüksek yem tüketiminin 20 g/kg katılan grupta olduğunu bildirilmiştir. Arpat (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, dönemlere göre ortalama yem tüketimleri bakımından gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli (P<0.05) bulunmakla birlikte; en yüksek değerlerin %0.5 KB ilave edilmiş grupta ve en düşük değerlerin ise %1 KB ilaveli grupta olduğu bildirilmektedir. Rasyona askorbik asit ve farklı miktarlarda kuşburnu meyvesi katılmasının yumurtacı tavuklarda yumurta sarısı renk değerlerinden L* (parlaklık) ve a* (kırmızılık) değerlerini etkilemediği, c* (Chroma, Rengin Doygunluğu) ve b* (Sarılık) değerlerini yükselttiği (P<0.001), H* değerini yalnızca askorbik asit ilavesinin artırdığı (P<0.01) görülmüştür. Yumurta sarısı renk değerleri sayısal olarak incelendiğinde en yüksek L (parlaklık) ve a (kırmızılık) değerleri 15 g/kg kuşburnu katılan grupta tespit edilmiştir. H* değeri bakımından en yüksek değer ticari askorbik asit katılan grupta ve kontrol grubuna göre farklılık önemli, C* değeri ve b* (Sarılık) değerleri bakımından en yüksek değerler 15 g/kg kuşburnu katılan grupta tespit edilmiş ve kontrol grubuna göre farklılık çok önemli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6). Bu sonuçlar Roch skalasında elde edilen değer ile uyusmaktadır. Yapılan bir çalışmada, yumurtacı tavukların rasyonlarına % 0, 0.5,

1, 2, 4 ve 8 düzeylerinde kuşburnu ile sentetik sarı renk maddesi katılmıştır. Yumurta sarısı L değeri bakımından 1. dönemde önemli olmadığı (P>0.05), 2., 3., 4. ve 5. dönemlerde çok önemli (P<0.01), a değeri bakımından tüm gruplar arasındaki farklılıklar önemli (P<0.001), b değeri bakımından 1.,3. ve 4. dönemlerde önemli (P<0.001), 2. dönemde önemli (P<0.05), 5. dönemde ise önemli olmadığı (P>0.05) bildirilmiştir (Arpat 2016). Yapılan bir çalışmada, yumurta tavuklarının rasyonlarına katkısız (kontrol), vitamin E, %2.5 düzeyinde kısıcı kiraz ezmesi, kuşburnu ve adaçayı ilaveleri yapılmıştır. Sonuçta yumurta sarısı renk değerleri olan L (parlaklık), a (kırmızılık) ve b* (Sarılık) değerleri açısından katkı grupları arasında istatistiksel olarak farklılığın bulunmadığı bildirilmektedir (Loetscher ve ark. 2014). Rasyona askorbik asit ve farklı miktarlarda kuşburnu meyvesi katılmasının yumurtacı tavuklarda rektal sıcaklık değerlerini etkilemediği ve rektal sıcaklık düşüşü sayısal olarak en az 10 g/kg kuşburnu meyvesi katılan grupta tespit edilmiştir (Tablo 7). Yapılan bir çalışmada, broylerlerin rasyonlarına, 0, 10, 20, ve 30 g/kg kuşburnu katılmış ve ilk sıcaklık ölçümünde, 10 ve 20 g/kg kuşburnu katılan gruplarda, son sıcaklık ölçümünde ise kontrol, 10 ve 20 g/kg kuşburnu katılan gruplarda diğerlerine göre istatistiksel olarak önemli (P<0.05) olacak şekilde daha yüksek sıcaklık artışı elde edildiği bildirilmiştir (Tekeli 2014). Bu çalışmalar arasındaki farklılık, hayvan türleri ve dolayısıyla tükettikleri yem miktarları farklı olacağı için almış oldukları vitamin C

miktarlarının farklılığına atfedilebilir. Mevcut çalışmada yumurtacı tavuklar kullanılırken, diğer çalışmada etlik piliç kullanılmıştır.

SONUÇ

Yumurtacı tavuk rasyonlarına askorbik asite alternatif olarak kuşburnu meyvesi ilave edilmesinin yumurtacı tavuklarda, yumurta sarı ağırlığı ve Roch renk skala değeri kuşburnu meyvesi katkısının kontrol grubuna göre iyileşme sağladığı, yumurtacı tavukların rasyonlarına kuşburnu meyvesinin katılmasının, yumurta sarısı renginde ve kırmızılığında sayısal olarak iyileşme meydana getirdiği tespit edilmiştir. Yumurtlama performansı değerleri olan, haftalık yumurta sayısı, yumurta verimi ve toplam yumurta ağırlığı ile yumurta sarısı ve kırmızılığı değerlerinin, sayısal olarak diğer tüm gruplardan daha yüksek değerde sahip olması bakımından rasyonlara 15g/kg düzeyinde kuşburnu meyvesinin katılabileceği önerilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2015-ZF-B166 numaralı bireysel araştırma projesi olarak Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.



KAYNAKLAR

- Ağaoglu YS, Ayfer M, Fidan Y ve ark. (1987).** Bahçe Bitkileri. A.Ü.Z.F. Yay, Ankara.
- Adesola AA, Ng'ambi JW, Norris D (2013).** Effect of Ascorbic Acid Supplementation to the Diets of Indigenous Venda Hens on Productivity of Their Progenies Aged 8 To 13 Weeks. *Indian J Anim Res*, 47(2), 97-104.
- Alves FMS, Felix GA, Almeida Paz ICL, Nääs IA, Souza GM, Caldara FR, Garcia RG (2012).** Impact of Exposure to Cold on Layer Production. *Braz J Poultry Sci*, 14(3), 159-232
- Arpat (2016).** Yumurta tavuğu rasyonlarına kuşburnu ilavesinin performans yumurta iç ve dış kalite özelliklerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- Anonim (1).** <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2013/07/20130718-7.htm> Erişim tarihi: 21.06.2020
- Anonim (2).** http://ec.europa.eu/food/food/animalnutrition/feedadditives/comm_register_feed_additives_1831-03.pdf Erişim tarihi: 04.07.2013
- Bown D (1996).** Encyclopedia of Herbs and Their Uses. The Royal Horticultural Society, Dorling Kindersley Limited, London.
- Cayan H, Erener G (2015).** Effect of olive leaf (*Olea europaea*) powder on laying hens performance, egg quality and egg yolk cholesterol levels. *Asian Australasian J Anim Sci*, 28, 538-543.

- Çelik F (2005).** Türkiye'de Kuşburnu Seleksiyonları. Doktora semineri, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Cemeroğlu B (2007).** Gıda Analizleri. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları. Ankara.
- Çınar İ, Alma H, Çolakoğlu AS (2004).** Kuşburnu Karotenoid Pigmentlerinin Ekstraksiyonu ve Gıdalarda Kullanım Potansiyellerinin Belirlenmesi. Geleneksel Gıdalar Sempozyumu, Van.
- Çimrin T, Demirel M (2016).** Yumurtacı Tavuk Yemlerine Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) Uçucu Yağ İlavesinin Performans, Yumurta Kalite Kriterleri ve Yumurta Sarısı Lipit Oksidasyonu Üzerine Etkisi. *Türk tarım gıda bilim teknoloj derg*, 4(2), 113-119.
- Değirmencioglu T, Ak A (2003).** Güz Döneminde Besiye Alınan Hindilerde Askorbik Asit Uygulamasının Besi Performansı ve Bazı Kasrka Özelliklerine Etkileri. *Ulud Üniv Ziraat Fak Derg*, 17(2), 18.
- Düzgüneş O, Kesici T, Kavuncu O, Gürbüz F (1987).** Araştırma ve Deneme Metodları. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara.
- Duru N (2008).** Kuşburnu Nektarındaki Karotenoidlerin Depolama Stabilitesi. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Erge HS (2007).** Domateste (*Lycopersicon esculentum*) Karotenoid Madde Dağılımı ve Antioksidan Aktivite. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
- Esenbun N, Macit M, Karaoglu M ve ark. (2011).** A study on possibility of Rosa canina seed use as feed ingredient in diets of Morkaraman male lambs. *Trop Anim Health Prod*, 43, 1379-1384.
- Kadacal Ç, Nas S (2004).** Kuşburnu Deyip Geçmeyin. *Cine Tarım Dergisi*, 49.
- Kutlu HR, Forbes JM (1993).** Changes in Growth and Blood Parameters in Heat-Stressed Broiler Chickens in Response to Dietary Ascorbic Acid. *Livest Prod Sci*, 36, 335-350.
- Lara LJ, Rostagno MH (2013).** Impact of Heat Stress on Poultry Production. *Animals*, 3, 356-369
- Loetscher Y, Kreuzer M, Messikommer RE (2014).** Late laying hens deposit dietary antioxidants preferentially in the egg and not in the body. *J Appl Poult Res*, 23, 647-660.
- Manisha, Hasan W, Rajak R, Jat D (2017).** Oxidative Stress And Antioxidants: An Overview. *IJAR*, 2(9), 110-119.
- Njoku PC (1986).** Effect of Dietary Ascorbic Acid (Vitamin C) Supplementation on the Performance of Broiler Chickens in a Tropical Environment. *Anim Feed Sci Technol*, 16, 17-24.
- Rossi P, Nunes JK, Rutz F et al. (2015).** Effect of sweet green pepper on yolk color and performance of laying hens. *J Appl Poult Res*, 24, 10-14.
- Saraçoğlu İA (2006).** Bitkisel Sağlık Rehberi. Gün Ofset, İstanbul.
- SAS (2014).** SAS/STAT. Statistical analysis system for Windows. Released version 9.4. SAS Institute Incorporation, Cary, NC, USA.
- Shalaei M, Hosseini SM, Zergani E (2014).** Effect of different supplements on eggshell quality, some characteristics of gastrointestinal tract and performance of laying hens. *Vet Res Forum*, 5(4), 277-286.
- Shit N, Singh RP, Sastry KVH et al. (2012).** Effect of Dietary L-ascorbic Acid (L-AA) on Production Performance, Egg Quality Traits and Fertility in Japanese Quail (*Coturnix japonica*) at Low Ambient Temperature. *Asian-Aust J Anim Sci*, 25, 7, 1009-1014.
- Tekeli A (2014).** Effect of Rosehip Fruit (*Rosa canina* L.) supplementation to rations of broilers grown under cold stress conditions on some performance, blood, morphological, carcass and meat quality characteristics. *Europ Poult Sci*, 78.



Microbiological Risks and Portion Analyse of Stuffed Mussels Sold in Istanbul

B. İrem OMURTAG KORKMAZ¹ Serol KORKMAZ² Mustafa YÜCE^{3*}

Ümran SOYOĞUL GÜRER⁴

¹ Marmara University, Faculty of Health Science, Department of Nutrition and Dietetics, İstanbul, Turkey

² Pendik Veterinary Control Institute, Ministry of Agriculture and Forest, İstanbul, Turkey

³ Mardin Artuklu University, Faculty of Health Science, Department of Nutrition and Dietetics, Mardin, Turkey

⁴ Marmara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Microbiology, İstanbul, Turkey

Received: 07.10.2019

Accepted: 10.04.2020

ABSTRACT

In this study, stuffed mussels were collected from 50 selling points in Istanbul, consist of street vendors (n=38) and retail shops (n=12), analyzed microbiologically and weighted per portion. Mean Total Aerobic Count result was $7.38 \pm 1.01 \log_{10}$ cfu/g among the samples. *Coliform* was isolated from 44% of samples ($2.85 \pm 0.57 \log$ cfu/g), *Escherichia coli* from 12% of samples ($3.76 \pm 0.71 \log$ cfu/g), *Staphylococcus aureus* from 4% ($4.15 \pm 0.30 \log$ cfu/g), *Bacillus cereus* in 2% ($2.78 \log$ cfu/g) and *Bacillus licheniformis* in 4% ($3.18 \pm 0.08 \log$ cfu/g) of samples. *Listeria ivanovii* was isolated from 2% of samples (in 25 g). No *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* were detected. Level of *Staphylococcus* spp. (*S. aureus* + *S. epidermidis*) contamination was significantly higher in the retail shop ($P < 0.05$). The mean portion per stuffed mussel was 16.78 ± 5.62 g. Except for the result of *Staphylococcus* spp., microbiological analyses and a gram of portions did not show a significant difference between retail shops and street vendors ($P > 0.05$). However, an inappropriate level of *S. aureus* contamination in retail shops remain a food safety gap. Furthermore, the mean results of portions are assumed to be used in predictive microbiology studies.

Keywords: Food Safety, Food Microbiology, Mussels

ÖZ

İstanbul'da Satılan Midye Dolmalardaki Mikrobiyolojik Riskler ve Porsiyon Analizi

Bu çalışmada İstanbul'da sokakta (n=38) ve kapalı restoranda (n=12) satışa sunulan toplam 50 farklı noktadan midye dolma örneği toplanarak mikrobiyolojik inceleme ve porsiyon analizi yapılmıştır. Örneklerin Toplam Aerobik Bakteri sayısı ortalama $7.38 \pm 1.01 \log_{10}$ kob/g olarak bulunmuştur. *Coliform* grubu %44 ($2.85 \pm 0.57 \log$ kob/g), *Escherichia coli* %12 ($3.76 \pm 0.71 \log$ kob/g), *Staphylococcus aureus* %4 ($4.15 \pm 0.30 \log$ kob/g), *Bacillus cereus* %2 ($2.78 \log$ cfu/g) ve *Bacillus licheniformis* %4 ($3.18 \pm 0.08 \log$ cfu/g) oranında izole edilmiştir. *Listeria ivanovii* %2 oranında tespit edilmiştir. *Clostridium* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* tespit edilmemiştir. *Staphylococcus* spp. (*S. aureus* + *S. epidermidis*) kontaminasyon düzeyi restoranlarda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Midye dolmaların adet porsiyonu ortalama 16.78 ± 5.62 g olarak tartılmıştır. *Staphylococcus* spp. sonuçları dışında mikrobiyolojik analizler ve porsiyon gramajları restoranlar ile sokak satış noktaları arasında anlamlı bir fark göstermemiştir ($P > 0.05$). Ancak *S.aureus*'un kapalı restoranlarda tüketim için uygun düzeyin üzerinde tespit edilmesi bir gıda güvenliği açığının bulunduğuna işaret etmektedir. Porsiyon ortalamalarının ilerde prediktif mikrobiyoloji çalışmalarında kullanılabilceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Gıda Güvenliği, Gıda Mikrobiyolojisi, Midye

INTRODUCTION

Stuffed mussel is one of the most popular street food consumed in Istanbul, Turkey (Güzeler and Özbek 2017). It is mostly sold by street vendors and available in retail shops (Kisla and Uzgun 2008). In most case, unemployed immigrants collectively help for the preparation of stuffed

mussel and sell on the streets (Eraniş Demirli et al. 2015). Thus, in retail shops is the expected health risk is low, however unregulated street vendors bear the risk of illness.

Several foodborne bacterial pathogens, such as *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *Salmonella* spp. and *C. perfringens* and

*Corresponding author: irem.omurtag@marmara.edu.tr

*This research article was summarized from the third author's master thesis.



also viruses were isolated from stuffed mussels in former studies (Bingöl et al. 2008; Ateş et al. 2011). High frequency of *Coliform* and different amount of *B. cereus*, *S. aureus* and *Vibrio* spp. were detected in stuffed mussels collected from street vendors of Turkey (Ergönül et al. 2014). According to the microbiological results of Bingöl et al. (2008), 18.4% of stuffed mussels sold in Istanbul were contaminated in an unacceptable limit of consumption. Additionally, related to the consumption of stuffed mussels a life-threatening case has been also reported in Turkey (Urazel et al. 2014).

Stuffed mussel is particularly consumed in high demand areas of Istanbul. Most of the sellers prefer to calculate the portion according to the number of consumed stuffed mussels. However, consumed portion, i.e. the amount of rice and mussel, varies by the consumer's preference. However, there is lack of information in the literature on the average grammage of the edible portion of stuffed mussel, which can be useful for studies on the risk/benefit assessment not only microbial but also chemical contaminants and dietary value of this food item.

Hence, in this study stuffed mussels sold in street vendors and retail shops (restaurants) in major places in Istanbul were selected for investigation. Ready-to-eat stuffed mussels were collected from 50 different selling points and analyzed microbiologically. Regard to the amount of edible portion per stuffed mussel, the results of this study is assumed to be used for future predictive microbiology and dietary studies.

MATERIALS and METHODS

Sampling plan

Stuffed mussels were collected from 50 different locations (10 samples from each) including 38 street vendors and 12 retail shops in Istanbul. Sampling was performed with the assumption of increased temperature and decreased hygienic quality (related to the high temperature) in the summer month (June 2016). All the samples were transported to the laboratory in a refrigerated box and immediately analyzed.

Microbiological analyses

Edible components were weighed and 25 g of each sample was transferred to Stomacher filter bags and 225 ml of enrichment solutions were added (1:10 ratio). Afterward, samples were homogenized in Stomacher bags and tenfold serial dilution was prepared with Maximum Recovery Diluent (Oxoid CM0733). Appropriate dilutions were spread onto Total Aerobic Count (TAC) and selective agar plates for enumeration. The name of the bacteria investigated and media used in the isolations are shown in Table 1.

Edible portion weights

Three samples from each selling point were weighted without shell (only mussel meat and rice components). Mean results of grammage were calculated and compared between street vendors and restaurants.

Data analyses

Results of microbiological analyses transformed to log₁₀ unit by using MS Excel and all counts were analyzed statistically with SPSS (version 11.5). A possible relationship between the microflora and weight results was observed for street vendors and retail shops according to t-test and one-way Anova test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Table 1. Isolation and identification procedures of the investigated bacteria

Investig. bacteria	Media	Incuba.	Reference
TAC	Plate Count Agar (Oxoid CM0325)	30°C, 48 h	(ISO 2003)
<i>E.coli</i>	Coli ID agar (BioMérieux 42017)	42°C, 24 h	(Omurtag et al. 2012)
<i>Coliform</i>	Coli ID agar (BioMérieux 42017)	42°C, 24 h	(Omurtag et al. 2012)
<i>Staphylococcus</i> spp.	Baird-Parker Agar (Merck Nr.1.05406) with egg yolk (Merck Nr.1.03784) ID 32 STAPH (BioMérieux)	37°C, 48 h	(Omurtag et al. 2012)
<i>Bacillus cereus</i>	BACARA agar (BioMérieux) API 50 CHB/E (Biomerieux)	37°C, 24 h	(Thepaut and Soriano 2012, Tallent et al. 2012)
<i>Salmonella</i> spp.	Buffered Peptone Water (Oxoid CM0509) MSRV motility agar (Oxoid CM0910) XLD-agar (Merck Nr.1.05287) API 20 E (BioMérieux)	37°C, 24 h 42°C, 24 h 37°C, 24 h	(Omurtag et al. 2012)
<i>Clostridium</i> spp.	TSC agar (Merck Nr. 111972) API 20 A, rapid ID 32 A	37°C, 24 h anaerobically	(Rhodehamel and Harmon 2001)
<i>Listeria</i> spp.	Fraser Broth [Fraser Broth Base (Oxoid CM0895) Fraser Listeria selective supplement (Merck Nr.1.00093), Ammonium-ferric(III)-citrate (Merck 3762) ALOA Agar (BioMérieux) API Listeria (BioMérieux)	37°C, 37 h	(Omurtag et al. 2012)
<i>Campylobacter</i> spp.	Bolton Broth (Oxoid CM0983, with supplement SR0208E) m-CCDA (Oxoid CM0739, with supplement SR0155E) API CAMPY (Biomerieux)	42°C, 48 h, microaerobically	(Omurtag et al. 2012)

RESULTS

Among 50 selling points, TAC levels of samples ranged from 4.31 to 8.60 log₁₀ cfu/g, with a mean of 7.38±1.01 log cfu/g. TAC levels did not show a significant difference between street vendors and retail shops. Almost half of the samples were contaminated with *Coliform* (44%), whereas *Escherichia coli* (12%) was most frequently isolated

pathogen, which from this follows *Staphylococcus aureus* (4%) and *Bacillus cereus* (2%). Except for one stuffed mussel, most of the samples contaminated with *E.coli* did not contain *Coliform*, which is usually associated with the poor hygienic condition. One sample was contaminated with *Listeria ivanovii* (2%), and two samples with *Bacillus licheniformis* (4%). All of the results of microbiological analyses were presented in Table 2.

Table 2. Comparison of microbiological analyses (mean log₁₀ cfu/g) and portion results of stuffed mussels according to the selling point (n=50)

Selling point	TAC (n=50)		<i>E.coli</i> (n=6)		<i>Coliform</i> (n=22)		<i>S. aureus</i> (n=2)		<i>S. epidermidis</i> (n=1)		<i>Bacillus cereus</i> (n=1)		<i>Bacillus licheniformis</i> (n=2)		<i>Listeria ivanovii</i> * (n=1)		Weight of edible component g / stuffed mussel
	mean	%	mean	%	mean	%	mean	%	mean	%	mean	%	mean	%	+/-	%	
Street vendor (n=38)	7.37 ± 0.98	100	4.09 ± 0.58	8	2.83 ± 0.62	14	2.30	2	-	-	-	-	3.09 ± 0.12	4	+	2	15.63 ± 5.58
Retail shop (n=12)	7.39 ± 1.17	100	3.11 ± 0.47	4	2.88 ± 0.47	30	6	2	5.57	2	2.78	2	-	-	-	-	20.40 ± 5.97
Overall	7.38 ± 1.01	100	3.76 ± 0.71	12	2.85 ± 0.57	44	4.15 ± 0.30	4	5.57	2	2.78	2	3.09 ± 0.12	4	+	2	16.78 ± 5.62
p-value	0.96		0.83		0.25		0.019**				0.78				-		0.336

**Listeria* spp. was not enumerated, ** *Staphylococcus* spp. level of contamination was significantly higher in retail shops (P <0.05)

Escherichia coli was twice more frequently isolated in street vendors when compared to retail shops, whereas *S. aureus* contamination in the retail shop was higher than the appropriate level of consumption (6 log kob/g) and this result showed a significant difference from street vendors (P <0.05). Another toxin-producing bacteria, *B.cereus*, was obtained only from a retail shop. In this study, *Clostridium* sp., *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* and *Campylobacter* spp. were not detected.

The weight of edible portion (rice and mussel meat) of stuffed mussels ranged from 7.68 g to 32.20 g, with a mean of 16.78±5.62 g. No significant difference was found in weight of samples between the selling points (Table 2).

DISCUSSION

As a result of being street food, in this study samples were mostly available in street vendors (38 of 50 selling points). TAC results varied between 4.31 log and 8.60 log cfu/g and was certainly higher than the recent studies conducted in Turkey, which varies from <1 log to 6.44 log cfu/g (Ergönül et al. 2014; Kök et al. 2015). Low microbiological quality of water, that mussels were collected from and additionally unhygienic condition during food preparation were suggested as some of the reasons of an unacceptable load of bacterial and viral contamination in stuffed mussel (Yılmaz et al. 2010; Ateş et al. 2011).

Studies conducted on the microbiological safety of this food item sold in Turkey found contamination with several foodborne pathogens, such as; *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Clostridium perfringens*, and *Vibrio* spp. (Bingöl et al. 2008; Yılmaz et al. 2010; Ateş et al. 2011; Ergönül et al. 2014).

Food inspectors evaluate stuffed mussel in the Food Security Criteria of Turkish Food Codex (TFC) under the ready-to-eat cold snack category (TFC 2011). Therefore, it is limited for *E. coli* as 101 cfu/g, and required no staphylococcal enterotoxins, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* contamination in 25 g of sample. According to the Production Hygiene Criteria of TFC cooked crustaceans with/without shell (which is a component of stuffed mussel) have limits for *E. coli* and coagulase-positive staphylococcus as 101 (1 log) cfu/g and 103 (3 log) cfu/g, respectively (TFC, 2011). In the present study, average *E. coli* (3.76 log cfu/g) and *S. aureus* (4.15 log cfu/g) contamination were above these values, which indicates a requirement of production hygiene improvement. Although there is no limit set for *B. cereus* within these criteria, its contamination bear risk for food safety, due to its toxin production potential.

Listeria ivanovii is rarely causing illness in human, but still one of the important foodborne pathogens. It is isolated in several studies from stuffed mussels (Kök et al. 2015; Guillet et al. 2010). However, *L. monocytogenes* was not isolated in most of the studies conducted on stuffed mussels (Terzi et al. 2015; Kök et al. 2015). In this study, *L. monocytogenes* is not isolated either, but *L. ivanovii* was determined in one sample from a street vendor. As well as other important foodborne pathogens such as *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Clostridium* spp. were not found. Thus, these results are promising when compared with the former studies.

On the other hand, retail shops in this study were more frequently contaminated with coliforms, *Staphylococcus* spp. and *B. cereus*. Regard to the significantly higher contamination rate in retail shops (particularly for

S. aureus) it is assumed that chance of cross-contamination, i.e. contact with other foodstuffs, is more common in retail shops than street vendors. Studies on technological applications in stuffed mussels showed that modified atmosphere packaging extended the shelf-life of stuffed mussels (Ulusoy and Ozden 2011) and lemon juice dressing decreased the level of *Salmonella* Typhimurium in the stuffed mussel (Kışla 2007). However, bacterial toxins resistant to food processing treatments; e.g. *S. aureus* enterotoxins and emetic toxin of *B. cereus* (EFSA 2012) should also be considered as an important hazard for retail shops.

In this study grammages of edible portions had a wide range (from 7.68 g to 32.20 g). This difference might be the result of the type of mussels used for preparation, e.g. some mussel species are smaller and take less amount of rice. Nevertheless, the mean amount of edible portions did not show statistical significance between street vendors (15.63±5.58 g) and retail shops (20.40±5.97 g). Following this result, as a standardized portion grammage by weighing the food item before selling, can be suggested rather than count per mussel.

In most of the studies, stuffed mussels have a high-level TAC and *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *L. ivanovii* were most isolated bacteria with different level of contamination. In this study, *S. aureus* contamination in a retail shop exceeded twice more (6 log cfu/g) the accepted limit in TFC (<3 log cfu/g). Thus, the high contamination count of TAC and Coliform, and *E. coli*, when compared with other studies, indicates a low hygienic status in both of the street vendors and retail shops. These results give an overview that *L. ivanovii* might be evaluated as a normal flora agent or a hygienic indicator of this food item. On the other hand, edible portion size affects the risk of exposure to several contaminants, as well as carry nutritional importance. Therefore it is assumed that the data of edible portion may be useful with additional information like pH and aw for future predictive microbiology studies.

CONCLUSION

As a remarkable result of this study, both of *S. aureus* and *B. cereus* were found in samples. Therefore, a possible exposure to these bacteria via consumption of contaminated stuffed mussels can be realized for a further risk assessment research.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Marmara University Research Council (BAPKO, SAG-C-YLP-111115-0504). The authors are thankful for the sincere support of Esra Dalkılıç during laboratory analyses. Also, Turkish 12th

Congress of Food was presented as a poster is printed as text summary of the proceedings.

REFERENCES

- Ateş M, Ozkizilcik A, Tabakoglu C (2011). Microbiological analysis of stuffed mussels sold in the streets. *Indian J Microbiol*, 51, 350-354.
- Bingöl B, Çolak H, Hampikyan H, Muratoglu K (2008). The microbiological quality of stuffed mussels (Midye Dolma) sold in Istanbul. *BFJ*, 110, 1079-1087.
- Eraniil Demirli M, Tuna Ultav Z, Demirtaş-Milz N (2015). A socio-spatial analysis of urban transformation at a neighborhood scale: The case of the relocation of Kadifekale inhabitants to TOKI Uzundere in İzmir. *Cities*, 48, 140-159.
- Ergönül B, Kundakçı A, Durgun S (2014). Hygienic quality of stuffed Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold by Street vendors in İzmir, Turkey. *J Food Safety Food Qual*, 65, 121-124.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2012). Scientific Opinion on Public health risks represented by certain composite products containing food of animal origin. *EFSA J*, 10, 2662.
- Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A et al. (2010). Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis*, 16, 136-138.
- Güzeler N, Özbek Ç (2017). Conceptual analysis of street flavors of Turkey. *Analele Universității din Craiova, seria Agricultură – Montanologie – Cadastru* (Annals of the University of Craiova - Agriculture, Montanology, Cadastre Series) Vol. XLVII.
- ISO 6887-6:2013 (2003). Microbiology of food and animal feed -- Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -- Part 6: Specific rules for the preparation of samples taken at the primary production stage.
- Kışla D (2007). Effectiveness of lemon juice in the elimination of *Salmonella* Typhimurium in stuffed mussels. *J Food Prot*, 70, 2847-2850.
- Kışla D, Uzun Y (2008). Microbiological evaluation of stuffed mussels. *J Food Protect*, 7, 616-620.
- Kök F, Şahiner C, Koçak P, Göksoy EÖ, Beyaz D, Büyükyörük S (2015). Determination of Microbiological Quality of Stuffed Mussels Sold in Aydın and İzmir. *MJEN*, 3, 70-76.
- Omurtag I, Smulders FJM, Hilbert F, Paulsen P (2012). Microbiological condition of chicken doner kebab sold in Vienna, Austria. *Arch Lebensmittelhyg*, 63, 142-146.
- Rhodehamel EJ, Harmon SM (2001). *Clostridium perfringens*. In: FDA (Ed.) Bacteriological Analytical Manual, Chapter 12. Silver Spring, Food and Drug Administration.
- Tallent SM, Rhodehamel EJ, Harmon SM, Bennett RW (2012). In: FDA (Ed.) Bacteriological Analytical Manual Chapter 14, *Bacillus cereus*. Food and Drug Administration.
- Terzi G, Gücükoğlu A, Çadirci Ö, Uyanık T, Alişarlı M (2015). Serotyping and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat foods in Samsun, Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 39, 211-217.
- Thepaut J, Soriano H (2012). Comparison of BACARA® agar, a new chromogenic medium and MYP agar for the enumeration of *B.cereus* in food sample. *Aes Chemunex-BioMérieux*.
- Turkish Food Codex (TFC) (2011). Turkish Food Codex, Regulation of microbiological criteria. Nr. 28157.
- Ulusoy S, Ozden O (2011). Preservation of stuffed mussels at 4 degrees C in modified atmosphere packaging. *J Aquat Food Prod Technol*, 20, 319-330.
- Urazel B, Çelikel A, Karbeyaz K, Akkaya H (2014). The evaluation of forensic cases reported due to food poisoning. *Dicle Med J*, 41, 113-117.
- Yılmaz H, Bostan K, Turan K et al. (2010). RealTime PCR detection of Norovirus in mussels collected from the bosphorus in Istanbul, Turkey. *Food Environ Virol*, 2, 64-68.



Presence and Prevalence of *Listeria* Species in the Inci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811)*

Hakan SANCAK^{1*} Emrullah SAĞUN²

¹ Bitlis Eren University, Tatvan Vocational School, Department of Food Processing, Bitlis, Turkey

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Van, Turkey

Received: 25.11.2019

Accepted: 10.04.2020

ABSTRACT

Lake Van is not a very convenient environment for life of both sea and freshwater fish due to its high alkaline (pH 9.8) and salty (0.21%) water and only pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) are present in the lake. In this study, the presence and prevalence of *Listeria* species in samples of the pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) living as an endemic species in Lake Van and taken from the market a total of 160 times for 12 months were examined. The method recommended by the United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) was used for the isolation and identification of *Listeria* species. Among the pearl mullet samples examined, *Listeria* spp. were isolated in 20 (12.50%) and of them *L. innocua* in 10 (6.25%) and *L. welshimeri* in 8 (5.00%) and *L. ivanovii* in 2 (1.25%) were identified. In this study, the presence of *Listeria* species in pearl mullet samples examined according to the seasons was revealed for the first time. Failure to identification of *L. monocytogenes* in any of the samples that is an important pathogen for humans, was assessed as an indicator that these fish did not constitute a public health risk in terms of listeriosis. As a result, *Listeria* spp. and other pathogenic microorganisms not to pose a risk to public health and in order to prevent the deterioration of fishes and reduce the economic losses, the transportation, storage and marketing of the caught fishes should be done under hygienic and cold conditions.

Keywords: Fish, Inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*), *Listeria* spp.

öz

İnci Kefalinde (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) *Listeria* Türlerinin Varlığı ve Yaygınlığı

Van Gölü yüksek derecede alkali (pH 9.8) ve tuzlu (%0.21) suyu ile hem deniz hem de tatlı su balıklarının yaşamı için çok elverişli bir ortam değildir ve gölde sadece inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) bulunmaktadır. Bu çalışmada, Van Gölü'nde endemik bir tür olarak yaşayan ve 12 ay süreyle toplam 160 defa piyasadan alınan inci kefali örneklerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı incelenmiştir. *Listeria* türlerinin izolasyon ve identifikasyonunda United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) tarafından önerilen metot kullanılmıştır. İncelenen inci kefali örneklerinin 20 (%12.50)'sinde *Listeria* spp. izole edilmiş ve bunların 10 (%6.25)'unda *L. innocua*, 8 (%5.00)'ünde *L. welshimeri* ve 2 (%1.25)'sinde de *L. ivanovii* identifiye edilmiştir. Bu araştırma ile mevsimlere göre incelenen inci kefali örneklerinde *Listeria* türlerinin varlığı ilk defa ortaya konmuştur. Hiçbir örnekte insanlar için önemli bir patojen olan *L. monocytogenes*'in belirlenmemesi bu balıkların listeriosis yönünden bir halk sağlığı riski oluşturmadığının göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, gerek *Listeria* spp. (özellikle *L. monocytogenes*) ve diğer patojen mikroorganizmaların halk sağlığı riski oluşturmaması ve gerekse balıkların bozulmasının önlenerek ekonomik kayıpların önüne geçilmesi için, avlanan balıkların nakil, depolama ve pazarlamasının hijyenik şartlarda ve soğukta yapılmasının gerekli olduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Balık, İnci kefali (*Chalcalburnus tarichi*), *Listeria* spp.

INTRODUCTION

In the fish production in inland waters, the pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) (Kuru 1985) belonging to *Cyprinidae* family takes the second place after carps.

Only pearl mullet inhabits in Lake Van (pH 9.8 and salinity of 0.21%), which is not a suitable environment for sea and freshwater fish (Sarı 2001). Pearl mullet, which is an endemic species, migrates from Lake Van the main habitat to the rivers in shoals in April and July in order to breed,

* Corresponding author: hsancak@beu.edu.tr

* This research article was summarized from the first author's PhD thesis.



and returns to the Lake after spawning (Danulat and Selcuk 1992).

Different species and numbers of microorganisms play a crucial role in the spoilage of the caught fishes, and fish contain many pathogenic microorganisms that cause food poisoning. In the studies, it has been determined that different fish species are contaminated with pathogenic microorganisms (Davies et al. 2001; Farber 1991; Heinitz and Johnson 1998; Lennon et al. 1984; Norrung et al. 1999; Vaz-Velho et al. 2001).

L. monocytogenes of *Listeria* species has been accepted as one of the most important food pathogens recently (Farber and Peterkin 1991), as it causes the diseases called as listeriosis in human and animals (Jones and Seeliger 1992). Listeriosis is mostly seen in pregnant women, infants, alcohol and drug addicts, elderly people and the immunosuppressed individuals (Bahk and Marth 1990; Farber and Peterkin 1991; Pinner et al. 1992; Schuchat et al. 1992) and the general clinical appearance of the disease is similar to meningitis or septicemia (Seeliger and Jones 1986).

Listeria species are present in various ambits such as environment, soil, feces, sewage, water, plants, animal feeds and nutrients (Bahk and Marth 1990; Bortolussi et al. 1985; Brackett 1988; Colburn et al. 1990). Mainly consumption of infected foods leads to the disease upon infection of the agent to human beings in listeriosis cases (Bahk and Marth 1990; Brackett 1988; Pinner et al. 1992; Schuchat et al. 1992). In addition to the environmental contamination in the listeriosis cases occurring due to the nutrients, preservation of the viability of *L. monocytogenes* poses significant risks in terms of public health (El-Kest et al. 1991; Walker et al. 1990). As the source of epidemics caused by *L. monocytogenes*, cabbage salad (Schlech et al. 1983), pasteurized milk (Fleming et al. 1985) and Mexican-type soft cheeses (Linnan et al. 1988) are primarily held responsible.

Until a research study reported that epidemic prenatal listeriosis was due to consumption of fresh fish and shellfishes (Lennon et al. 1984) and a case of sporadic listeriosis was due to consumption of undercooked fish (Facinelli et al. 1989), it was thought that aquatic products

were not to be so effective in listeriosis cases. After it is specified that aquatic products have a role in the infection of *L. monocytogenes* to humans, many researchers have examined the existence, prevalence and the reproductive abilities of *Listeria* species in seawater, sediment, fish and other aquatic products in various parts of the world (Adesiyun 1993; Colburn et al. 1990; Davies et al. 2001; Farber 1991; Fuchs and Surendran 1989; Gohil et al. 1995; Manoj et al. 1991; Norrung et al. 1999; Weagant et al. 1988).

In the studies on various nutrients provided for consumption in Van, *Listeria* species were isolated at different rates (Elibol 2003; Isleyici et al. 2006; Sağun et al. 2001; Sancak et al. 2003). However, no study on the presence of *Listeria* spp. in the pearl mullet was found. In this study, the presence and prevalence of *Listeria* species according to the seasons were examined in pearl mullet, which is an indispensable element with the amount of protein in the nutrition of the people living in the region and creates an important commercial source in family subsistence.

MATERIALS and METHODS

In this study, the pearl mullet (*Chalcalburnus tarichi*, Pallas 1811) samples taken from the market a total of 160 times for 12 months were used as a material. The samples taken in sterile bottles under aseptic conditions were taken to the laboratory in a cold chain (+4°C) and the analyses were started as soon as possible (Gökalp et al. 1995). After obtaining dorsal muscles of minimum five fish and parts taken from the skin, they were chopped thinly and mixed well and samples were taken from this mixture for analyses. The method recommended by USDA/FSIS was used to determine the *Listeria* species in pearl mullet samples (Cook 1998). pH values of homogenized fish samples were determined by using a micro pH-meter (Hanna, pH 211, Germany).

RESULTS

Distribution of *Listeria* species by seasons is as shown in Table 1.

Table 1. Distribution of *Listeria* species by seasons

Season	n	<i>Listeria</i> spp.	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. welshimeri</i>
Summer	40	1	1	-	-
Autumn	40	2	-	1	1
Winter	40	8	3	1	4
Spring	40	9	6	-	3
Total	160	20	10	2	8

DISCUSSION

Identification of *Listeria* species in pearl mullet at the rate of 12.50% may be associated by the transfer of the fish caught under non-hygienic conditions and the contamination of these microorganisms from the environment during launching.

As a matter of fact, the caught fishes are brought to the distribution centers by filling in the case and drums, distributed here mostly to hawkers, with wheelbarrow, tricycle, washbowl and drums offered for sale in non-hygienic environments and at ambient temperature.

Even though Embarek et al. (1997) and Pullela et al. (1998) reported that *Listeria* species could not be isolated in the fish samples examined, many researchers have stated that various *Listeria* species are isolated in the fish (Adesiyun 1993; Buchanan et al. 1989; Davies et al. 2001; Farber 1991; Gohil et al. 1995; Manoj et al. 1991; Nitcheva et al. 1990; Vaz-Velho et al. 2001).

In this study, the isolation rate of *Listeria* determined in pearl mullet samples was found to be higher than the isolation rates determined in the fish by some researchers (Gohil et al. 1995; Nitcheva et al. 1990). The isolation rates reported by Manoj et al. (1991) and Adesiyun (1993) are similar to the results specified in this study. Various *Listeria* species were reported to be isolated in 15 (26.79%) of 56 fish samples by Vaz-Velho et al. (2001), in 3 (30.00%) of 10 fresh sea foods by Fuchs and Surendran (1989), in 35 (61.00%) of 57 frozen sea foods by Weagant et al. (1988), in 5 (28.00%) of 18 fish and shellfish samples by Buchanan et al. (1989), and 10 (31.25%) of 32 fish samples by Farber (1991). The fact that the isolation rate of *Listeria* determined in pearl mullet samples was lower than the rates reported in various aquatic products may be due to the fact that the Lake Van in which this fish inhabits is not a suitable environment for the living of microorganisms. Indeed, Embarek (1994) reported that *Listeria* species can be found naturally in freshwater fish, but are not likely to be found in open seas or in fishes inhabiting in fresh salt waters. Differences between the studies may be associated with the sampling time and conditions, regional differences and the different levels of environmental contamination. Also, Farber and Peterkin (1991) reported that the number of samples examined with the methods used for isolation and identification may cause the findings to be different.

Obtaining different results in pearl mullet samples examined in summer, fall, winter, and spring seasons is compatible with statements by Karunasagar and Karunasagar (2000) reporting that various results were obtained in studies conducted at the same laboratory in different seasons and this could be associated different fish species and seasons. The low *Listeria* isolation in summer and autumn may be caused by the suppression of the production of *Listeria* species of the mesophilic microorganisms in the fish offered for sale under ambient temperature or by the aggravation of isolation. Indeed, while Guyer and Jemmi (1991) reported that different microorganism intensity in fish may play an important role in the development of *Listeria* species, Varabiouff (1990) stated that the microflora in the environment, may play an important role in the development of *Listeria* species.

Colburn et al. (1990) stated that *Listeria* species were determined in the fresh water (81%), salt water (33%) and sediment (30.4%) samples examined. The researchers stated that the different isolation rates in the samples examined may be caused by the competitive flora in the samples and the different salt ratios in the water where the fishes inhabit and the effect of urbanization and the surrounding animals. Especially, they stated that domestic livestock near the sites where fresh water samples were taken were observed and they may have contributed to the *Listeria* incidence identified in the samples. In this study, maximum *Listeria* isolation in the samples examined was detected in the spring season. The high rate of isolation in spring strengthens the possibility that fish migrating towards rivers to spawn in the spring season may be caught from rivers which are thought to be contaminated with the feces of surrounding animals and are a more suitable environment for the inhabitation of *Listeria*

species than Van Lake. High *Listeria* isolation rate in the samples examined in the winter season suggests that *Listeria* species may have been contaminated by the environmental sources at the stages after the fish were caught.

The fact that *L. innocua* (6.25%) was determined as dominant species in pearl mullet samples shows similarities opinions of the researchers reporting in different studies that *L. innocua* was found to be the dominant species in meat and seafood (Erol and Şireli 1999; Erol et al. 1999; Fuchs and Surendran 1989; Genigeorgis et al. 1989; Gohil et al. 1995; Nitcheva et al. 1990; Vaz-Velho et al. 2001; Weagant et al. 1988), with opinions of Şireli and Erol (1999) that *L. innocua* was more dominant in Turkey. Also, Petran and Swanson (1993) specified that *L. innocua* was produced more than *L. monocytogenes* in UVM and FB and accordingly, *L. innocua* became the predominant type within the colonies in the selective medium in which inoculation was done for isolation purposes. The fact that the enrichment broths used by the researchers are the same as the broths used in this study may have caused *L. innocua* to be isolated at a higher rate. Some researchers (Genigeorgis et al. 1989; Skovgaard and Morgen 1988) have reported that in meat products *L. innocua* is present 2-3 times more than *L. monocytogenes* and they have explained this by the shorter generation time of *L. innocua* compared to *L. monocytogenes*.

While the isolated species in the pearl mullet samples examined was mostly *L. innocua*, *L. monocytogenes* was not identified in any sample. This is compatible with the opinions of Curiale and Lewus (1994) who have reported that the generation period of *L. innocua* is shorter compared to *L. monocytogenes* and isolation of *L. monocytogenes* would be lower when there is *L. innocua* in the environment. However, the fact that *L. monocytogenes* was not isolated in any sample in this study is similar to the results of Fuchs and Surendran (1989) and Manoj et al. (1991), who reported that *L. monocytogenes* could not be isolated in the fish samples examined.

In a study (Boynukara et al. 1995) conducted in and around the Lake Van, it was reported that the total number of aerobic mesophilic microorganisms of the Lake Van was maximum 4.35×10^4 cfu/ml in the areas close to the settlement areas and maximum 1.96×10^3 cfu/ml in the areas distant from the settlement areas. Since there is no suitable environment for production of microorganisms due to alkaline and salt waters of the Lake Van and especially waters in the areas distant from settlement areas contain small amount of microorganisms, this made us think that fish were contaminated at stages until they were presented to consumer after they were caught. *Listeria* species, which are accepted to be the microorganisms that can be found almost everywhere in nature (Jones and Seeliger 1992) and whose source of aquatic organisms is estimated to be the environment (Karunasagar and Karunasagar 2000), may have contaminated the fish examined in this study by the environmental sources.

Andre and Genicot (1987) reported that *L. welshimeri* is particularly associated with environmental sources and rarely with the animal sources. Mostly the isolation of *L. welshimeri* (5.00%) after *L. innocua* (6.25%) in the pearl mullet samples strengthened the possibility that contamination may be associated with environmental sources and this result is similar to opinions of Buchanan

et al. (1989) reporting that *L. welshimeri* is a common contaminant in meat products and seafood.

The average pH values of 6.70 determined in the samples examined in this study was found between the pH values of 6.0-9.0 at which *Listeria* species can produce (Seeliger and Jones 1986). The average pH values reported in previous studies performed on fresh pearl mullet (Kılınççeker and Küçüköner 2003; Küçüköner et al. 2001) are slightly lower than the average pH value determined in this study and between the pH values that *Listeria* species can produce.

CONCLUSION

This study the presence of *Listeria* species in pearl mullet, submitted for consumption in Van, has been revealed for the first time, however, *L. monocytogenes*, a pathogenic species for humans, was not identified in any sample. The fact that *L. monocytogenes* could not be identified in any of the examined samples in this study can be evaluated as an indicator that pearl mullet does not constitute a public health risk for listeriosis. In order to determine the actual contamination level in the pearl mullet caught from the lake, the presence of *Listeria* species, especially *L. monocytogenes*, should also be investigated in other settlement areas where the fish is consumed. To avoid *L. monocytogenes* and other pathogen microorganisms from posing a public health risk, transport, storage, and marketing process of the caught fishes should be done under hygienic conditions and cold.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Research Fund of the Yuzuncu Yil University with the project number of 2002-VF-018.

REFERENCES

- Adesiyun AA (1993). Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafoods in Trinidad. *Food Mic*, 10, 395-403.
- Andre P, Genicot A (1987). First isolation of *Listeria welshimeri* in a human. *Zentralbl. Bacteriol. Microbiol und Hygiene, Series A*, 263 (4), 605-606.
- Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. Chapter 18, In: *Foodborne Diseases*, Cliver DO (Ed), 247-257, Academic Press Inc, San Diego, California.
- Bortolussi R, Schlech III WF, Albritton WL (1985). *Listeria*. Chapter 19, In: *Manual of Clinical Microbiology*, Lennette EH (Ed), 205-208, 4th Ed, American Society for Microbiology, Washington, DC, USA.
- Boynukara B, Sancak YC, Baydaş B, Sancak H, Berktaş M (1995). Van Gölünün mikrobiyolojik kirliliği ve halk sağlığı açısından değerlendirilmesi. *Veterinarium*, 6 (1-2), 37-39.
- Brackett RE (1988). Presence and persistence of *L. monocytogenes* in food and water. *Food Tech*, 4, 162-164.
- Buchanan RL, Stahl HG, Bencivengo MM, Corral FD (1989). Comparison of lithium chloride-phenylethanol-moxalactam and modified vogel jhonson agars for detection of *Listeria* spp. in retail-level meats, poultry, and seafood. *Appl Environ Mic*, 55, 599-603.
- Colburn KG, Kaysner CA, Abeyta CJR, Wekell MM (1990). *Listeria* species in a California coast Estuarine environment, *Appl Environ Mic*, 56 (7), 2007-2011.
- Cook LV (1998). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples, Chapter 8, In: "USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook, 3rd Ed, USA.
- Curiale MS, Lewus C (1994). Detection of *L. monocytogenes* in samples containing *L. innocua*. *J Food Prot*, 57 (12), 1048-1051.
- Danulat E, Selcuk B (1992). Life history and environmental conditions of the anadromous *Chalcalburnus tarichi* (Cyprinidae) in the highly alkaline lake Van, Eastern Anatolia, Turkey. *Arch Hidrobiol*, 126 (1), 105-125.
- Davies AR, Capell C, Jehanno D, Nychas GJE, Kirby RM (2001). Incidence of foodborne pathogens on European fish. *Food Control*, 12, 67-71.
- Elibol C (2003). Van'da çiğ olarak tüketime sunulan tavuk etlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Yüzüncü Yıl Üniv Sağlık Bil Enst, Van.
- El-Kest SE, Yousef AE, Marth EH (1991). Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage. *J Food Sci*, 56, 1068-1071.
- Embarek PKB (1994). Presence, detection and growth of *L. monocytogenes* in seafood, a review. *Int J Food Mic*, 23, 17-34.
- Embarek PKB, Hansen LT, Enger O, Huss HH (1997). Occurrence of *Listeria* spp. in farmed salmon and during subsequent slaughter: comparison of Listertest™ lift and the USDA method. *Food Mic*, 14, 39-46.
- Erol İ, Şireli UT (1999). Donmuş broiler karkaslarında *Listeria monocytogenes*'in varlığı ve serotip dağılımı. *Tr J Vet Animal Sci*, 23 (4), 765-770.
- Erol İ, Şireli UT, Gündeş B (1999). Piliç parça et ve iç organlarında *Listeria* türlerinin varlığı ve kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 46, 179-188.
- Facinelli B, Varaldo PE, Toni M, Casolari C, Fabio U (1989). Ignorance about *Listeria*. *BMJ*, 299 (6701), 738.
- Farber JM (1991). *Listeria monocytogenes* in fish products. *J Food Prot*, 54 (12), 922-934.
- Farber JM, Peterkin PI (1991). *L. monocytogenes*, a food-borne pathogen, a review. *Mic Rev*, 55, 476-511.
- Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England J Med*, 312 (7), 404-407.
- Fuchs RS, Surendran PK (1989). Incidence of *Listeria* in tropical fish and fishery products, *Lett Appl Mic*, 9, 49-51.
- Genigeorgis CA, Dutulescu D, Garayzabal JF (1989). Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J Food Prot*, 52 (9), 618-624, 630.
- Gohil VS, Ahmed MA, Davies R, Robinson RK (1995). Incidence of *Listeria* spp. in retail foods in the United Arab Emirates. *J Food Prot*, 58 (1), 102-104.
- Gökcalp HY, Kaya M, Tülek Y, Zorba Ö (1995). Et ve Ürünlerinde Kalite Kontrolü ve Laboratuvar Uygulama Kılavuzu. 2. Baskı, Atatürk Üniv Zir Fak Ofset Tesisi, Erzurum.
- Guyer S, Jemmi T (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked Salmon. *Appl Environ Mic*, 57 (5), 1523-1527.
- Heinitz ML, Johnson JM (1998). The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. *J Food Prot*, 61 (3), 318-323.
- Isleyici O, Sancak YC, Sagun E, Ekici K (2006). *Listeria* species in Cig Kofte. *The Indian Vet J*, 83 (9), 1023-1024.
- Jones D, Seeliger HPR (1992). The Genus *Listeria*, Chapter 71, In: *The Prokaryotes*, 1595-1616, Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W, Schleifer KH (Ed), 2nd Ed, Vol 2, Springer-Verlag, New York, USA.
- Karunasagar I, Karunasagar I (2000). *Listeria* in tropical fish and fishery products. *Int J Food Mic*, 62, 177-181.
- Kılınççeker O, Küçüköner E (2003). Tuzlanmış inci kefali (*Chalcalburnus tarichi*) balığında fiziksel, kimyasal ve biyokimyasal değişimlerin saptanması. *Yüzüncü Yıl Üniv Zir Fak Tar Bil Derg*, 13 (1), 55-59.
- Kuru M (1985). Omurgalı Hayvanlar Sistematiği. Hacettepe Üniv Fen Fak Yay, Ders Kitapları Dizisi: 7, 2. Baskı, Hacettepe Üniv Fen Fak Basımevi, Beytepe, Ankara.
- Küçüköner E, Yurt B, Gençlelep H (2001). Van Gölü havzasında yaşayan İnci kefali (*Chalcalburnus tarichi*)'nin bazı kimyasal özelliklerinin araştırılması. *Dünya Gıda*, 60, 90-91.
- Lennon D, Lewis B, Mantell C et al. (1984). Epidemic perinatal listeriosis. *Pediatr Infect Dis*, 3, 30-34.
- Linnan MJ, Mascola L, Lou XD et al. (1988). Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England J Med*, 319 (13), 823-828.
- Manoj YB, Rosalind GM, Karunasagar I, Karunasagar I (1991). *Listeria* spp. in fish and fish handling areas, Mangalore, India. *Asian Fish Sci*, 4, 119-122.
- Nitcheva L, Yonkova V, Popov V, Manev C (1990). *Listeria* isolation from foods of animal origin. *Acta Mic Hungarica*, 37 (2), 223-225.
- Norrrung B, Andersen JK, Schlundt J (1999). Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int J Food Mic*, 53, 195-203.

- Petran RL, Swanson MJ (1993).** Simultaneous growth of *L. monocytogenes* and *L. innocua*. *J Food Prot*, 56 (7), 616-618.
- Pinner RW, Schuchat A, Swaminathan B et al. (1992).** Role of foods in sporadic listeriosis, II-Microbiologic and epidemiologic investigation. *JAMA*, 267 (15), 2046-2050.
- Pullela S, Fernandes CF, Flick GJ, Libey GS, Smith SA, Coale CW (1998).** Indicative and pathogenic microbiological quality of aquacultured finfish grown in different production systems. *J Food Prot*, 61 (2), 205-210.
- Sağun E, Sancak YC, İşleyici Ö, Ekici K (2001).** Van ve çevresi süt ve otlu peynirlerinde *Listeria* türlerinin varlığı ve yaygınlığı üzerine bir araştırma. *Tr J Vet Animal Sci*, 25, 15-19.
- Sancak YC, İşleyici Ö, Elilibol C, Ekici K (2003).** Van'da tüketime sunulan kremalı pastalarda *Listeria* türlerinin varlığının belirlenmesi. *Yüzüncü Yıl Üniv Vet Fak Derg*, 13 (1-2), 8-11.
- Sarı M (2001).** Van Gölü İnci Kefali (*Chalcalburnus tarichi*, PALLAS 1811) Stok Miktarının Tahmini ve Balıkçılık Yönetim Esaslarının Belirlenmesi. 1. Baska, Sena Ofset, İstanbul.
- Schlech III WF, Lavigne PM, Bortolussi RA et al. (1983).** Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *The New England J Med*, 308 (4), 203-206.
- Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD et al. (1992).** Role of foods in sporadic listeriosis, I-Case-control study of dietary risk factors. *JAMA*, 267 (15), 2041-2045.
- Seeliger HPR, Jones D (1986).** Genus *Listeria*. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1235-1245, Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (Ed). Vol 2, Williams and Wilkins, Baltimore.
- Skovgaard NC, Morgen A (1988).** Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds and raw foods of animal origin. *Int J Food Microbiol*, 6, 229-242.
- Şireli UT, Erol İ (1999).** Hazır kıymalarda *Listeria* türlerinin araştırılması. *Tr J Vet Animal Sci*, 23 (2), 373-380.
- Varabiou Y (1990).** Incidence and recovery of *Listeria* from chicken with a pre-enrichment technique. *J Food Prot*, 53, 555-557.
- Vaz-Velho M, Duarte G, Gibbs P (2001).** Comparison of two pre-enrichments broths for recovering *Listeria* spp. from salmon (*Salmo salar*) and salmon-trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Control*, 12, 357-359.
- Walker SJ, Archer P, Banks JG (1990).** Growth of *L. monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Bacteriol*, 68, 157-162.
- Weagant SD, Sado PN, Colburn KG et al. (1988).** The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J Food Prot*, 51 (8), 655-657.



Determination of Oxidative Stress and Ceruloplasmin Levels in Sheep with Toxoplasmosis

Kadir BOZUKLUHAN¹ Oğuz MERHAN² Şemistan KIZILTEPE³
Ahmet HARMANKAYA⁴ Gürbüz GÖKÇE³

¹ Kafkas University, Kars School of Higher Vocational Education, Kars, Turkey

² Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Kars, Turkey

³ Kafkas University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Kars, Turkey

⁴ Kafkas University, Faculty of Science, Department of Chemistry, Kars, Turkey

Received: 15.11.2019

Accepted: 11.03.2020

ABSTRACT

The aim of the study was to determine the oxidative stress parameters as well as ceruloplasmin levels in sheep with toxoplasmosis. In order to investigate biochemical parameters, a total of 30 sheep were used in the study. According to ELISA test results, 20 sheep were infected with toxoplasmosis, while 10 healthy sheep sera had antibodies negative. Biochemical analysis included total oxidant capacity (TOC), total antioxidant capacity (TAC), oxidative stress index (OSI), nitric oxide (NO) and ceruloplasmin levels. TAC value was found to be statistically significantly lower, and TOC and OSI values were found to be higher in sheep with toxoplasmosis compared to those of the control group. NO and ceruloplasmin values were nonsignificantly. As a result, it was concluded from the data in the study that toxoplasmosis caused changes in oxidant and antioxidant capacity in sheep.

Keywords: Oxidative stress, Sheep, Toxoplasmosis

ÖZ

Toksoplazmozisli Koyunlarda Oksidatif Stres ve Seruloplazmin Düzeylerinin Belirlenmesi

Çalışmanın amacı toksoplazmozisli koyunlarda oksidatif stres parametrelerinin yanı sıra seruloplazmin düzeylerinin belirlenmesidir. Çalışmada biyokimyasal parametreleri araştırmak için ELISA test sonuçlarına göre 20 tanesi toksoplazmozisle enfekte, 10 sağlıklı olmak üzere, toplamda 30 adet koyun kullanıldı. Biyokimyasal olarak total oksidan kapasite (TOK), total antioksidan kapasite (TAK), oksidatif stres indeksi (OSİ), nitrik oksit (NO) ve seruloplazmin düzeyleri belirlendi. Yapılan analizler sonucunda toksoplazmozisli koyunlarda TOK ve OSİ değerinin arttığı, TAK'ın azaldığı, NO ve seruloplazmin değerlerinin ise istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Sonuç olarak, çalışmadaki verilerden toksoplazmozisin koyunlarda oksidan ve antioksidan kapasitede değişikliklere neden olduğu kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Oksidatif stres, Koyun, Toksoplazmozis

GİRİŞ

Toksoplazmozis, hücre içi zorunlu bir protozoon (*Toxoplasma gondii*) tarafından oluşturulan zoonoz bir hastalıktır (Hökelek ve Açıcı 2009; Özcel 2013). Küçük ruminantlarda (üretim kaybı, tedavi gideri, kontrol harcamaları vb) ve insanlarda (tanı, tedavi, iş gücü vb) önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Özcel 2013; Varlı ve ark. 2016). Koyun ve keçilerde subklinik seyretmekle beraber, pnömni, enterit, nörolojik bozukluklar, ensefalit, canlı veya zayıf yavru doğumu, 3-4 gün içerisinde ölüm veya aborta neden olmaktadır (Hill ve ark. 2005; Özcel 2013; Özmutlu Çakmak ve Karatepe

2017). Organizmanın normal oksijen kullanımı sırasında mitokondri tarafından üretilen serbest radikaller lipidlerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin yapısında değişiklik oluşturarak oksidatif hasara neden olurlar (Tabakoğlu ve Durgut 2013; Karabulut ve Gülay 2016). Serbest radikallerin oluşturduğu hasarı önlemek amacıyla görev yapan sistem antioksidan sistem olarak tanımlanmakta ve bu sistem radikal üretimini engelleyerek ve/veya oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırarak etki göstermektedir (Süleyman ve ark. 2018). Normalde organizmada oksidan ve antioksidanlar arasında bir denge söz konusu iken, organizmada stres, kronik hastalık ve



enfeksiyonlar immun sistemi uyarmakta, bunun sonucu olarak da serbest radikal miktarının artması nedeniyle doku hasarı oluşur (Atmaca ve ark. 2015; Karabulut ve Gülay 2016). Yapılan çalışmalarda lokal ve/veya sistemik yangı ya da enfeksiyon durumlarında toplam oksidan/antioksidan kapasite (TOK, TAK) ve oksidatif stres indeksinin (OSİ) değişebileceğini ve non-invaziv belirteç olarak kullanılabilmesi bildirilmektedir (Celi ve Gabai 2015; Merhan ve ark. 2017b; Aydoğdu ve ark. 2018). Nitrik oksit (NO), nitrik oksit sentazlar vasıtasıyla L-arginininden L-sitrullin oluşturulması esnasında oluşan üründür. NO, bakteri, virus ve parazitlere karşı savunmada hem bu organizmalarla direk savaşta lökositler tarafından kullanılmakta hem de yangı doğurucu özelliğe sahip olan bir moleküldür (Atakişi ve Merhan 2017). Antioksidan sistemde yer alan seruloplazmin, hücreleri oksidatif hasara karşı koruma ve antimikrobiyal aktivite gibi fonksiyonlarının yanı sıra orta derecede önemli bir akut faz proteindir (Cerone ve ark. 2000). Yukarıdaki bilgiler ışığında çalışmadaki amacımız toksoplazmozis ile enfekte koyunlarda oksidatif stres parametreleri (TOK, TAK, OSİ ve NO) ile birlikte seruloplazmin düzeylerinin araştırılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu 2014/53 sayılı raporu uyarınca yürütüldü. Çalışmada ELISA test

sonuçlarına göre 20 adet toksoplazmozis ile enfekte ve 10 adet sağlıklı koyun kullanıldı. Hayvanların vena jugularis'inden antikoagülsüz tüplere kan örnekleri toplandı. TOK ve TAK düzeyi ticari test kiti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak yapıldı. OSİ ise [TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ ekivalan/L)/10 x TAK (mmol Troloks ekivalan/L)] formülü kullanılarak hesaplandı (Karababa ve ark. 2013). NO analizi, Miranda ve ark. (2001)'nin, seruloplazmin ise Colombo ve Ricerich'in (1964) bildirdikleri metotlara göre kolorimetrik olarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

Çalışma verilerinin değerlendirilmesinde SPSS 20.0 paket programı kullanıldı. Analizlerde grupların normal dağılım gösterme durumu Kolmogorov-Smirnov testi yapılarak değerlendirildi. Normal dağılım gösterme durumunda, grupların karşılaştırılmasında Student's T testi kullanıldı.

BULGULAR

Yapılan analiz sonucunda toksoplazmozisli koyunlar ile kontrol grubundaki hayvanlar karşılaştırıldığında TOK ($P<0.01$) ve OSİ ($P<0.05$) değerlerinin kontrol grubuna göre yükseldiği, TAK değerinin ($P<0.05$) ise kontrol grubuna göre düştüğü, NO ve seruloplazmin düzeyinin ise arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi (Tablo1).

Tablo 1. Toksoplazmozisli ve sağlıklı koyunlarda TAK, TOK, OSİ, NO ve seruloplazmin düzeyleri

Table 1. TAC, TOC, OSI, NO and ceruloplasmin levels in healthy and sheep with toxoplasmosis

	Kontrol	Enfekte	P
TAK (mmol Troloks Ekivalan/L)	1.35±0.15	0.81±0.09	*
TOK ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Ekivalan/L)	6.22±0.49	9.45±0.64	**
OSİ (Arbitrary Birim)	0.50±0.06	1.35±0.24	*
NO ($\mu\text{mol/L}$)	33.14±2.18	39.71±3.69	NS
Seruloplazmin (mg/dL)	12.54±1.35	14.63±1.29	NS

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, NS: Önemsiz

TARTIŞMA ve SONUÇ

Toksoplazmozis, insanlar da dâhil olmak üzere sığır, koyun, keçi gibi çiftlik hayvanlarında görülen, üretim kaybı, tedavi gideri ve kontrol harcamalarının yanı sıra insanlarda tanı, tedavi, iş gücü kaybı gibi önemli ekonomik kayıplara neden olan paraziter bir hastalıktır (Can 2010; Varlı ve ark. 2016). Hastalık ayrıca halk sağlığı yönünden de önemli bir yere sahip olup düşüklere, anomalilere veya ölü doğumlara neden olmaktadır (Dubey ve Jones 2008; Zhou ve ark. 2011; Varlı ve ark. 2016). Organizmada stres, kronik hastalık ya da toksoplazma gibi paraziter bir enfeksiyon durumunda immun sistemde görevli fagositöz yapan hücreler tarafından serbest radikal miktarı artmakta ve doku hasarları meydana gelmektedir (Aydoğdu ve ark. 2018). Birçok hastalığın ve yangısal durumun patogeneğinde rol oynayan oksidatif stresin belirlenmesinde birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler uzun zaman ve emek isteyen, karmaşık, pahalı yöntemlerdir ve oksidan/antioksidan moleküllerin tek tek ölçülmesi yalnızca ölçümü yapılan molekülün değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Bu nedenle yapılan çalışmalarda oksidan/antioksidan dengenin

belirlenmesi için tek tek oksidanların ve antioksidanların ölçümünden ziyade, TAK ve TOK ölçümünün daha kolay olduğu bildirilmektedir (Erel 2004; Erel 2005). TOK düzeyinin TAK düzeyine oranı olarak tanımlanan OSİ ise oksidatif stres düzeyinin bir göstergesidir. Poxvirus ile enfekte koyunlarda (İsı ve ark. 2008; Bozukluhan ve ark. 2018), sığırlarda şap (Bozukluhan ve ark. 2013; Devci ve ark. 2018), omfalit (Bozukluhan ve ark. 2016), brusella (Merhan ve ark. 2017b), hipodermosis (Merhan ve ark. 2017a) ve askaridiosis (Bozukluhan ve ark. 2017) gibi viral, bakteriyel ve paraziter hastalıklarda oksidatif stres geliştiği oksidan düzeyinin artarken antioksidan düzeyinin ise azaldığı bildirilmiştir. Yine Aydoğdu ve ark. (2018) köpeklerde yaptıkları bir çalışmada parvoviral enteritisli köpeklerde TOK ve OSİ'nin kontrol grubuna göre yükseldiğini bu nedenle oksidatif hasarın geliştiğini bildirmişlerdir. İlav olarak leishmaniasis (Gültekin ve ark. 2017), *Toxocara canis* ve *Toxascaris leonina* (Kozan ve ark. 2010) ile enfekte köpeklerde yapılan çalışmalarda da lipid peroksidlerin oluştuğu dolayısıyla da oksidatif stres geliştiği ve antioksidan miktarında azalma olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda farklı parazit türünün yerleştikleri organ ve dokuda serbest radikal miktarını

artırdığı, bu artışa bağlı olarak hücre ve doku hasarlarının meydana geldiği bildirildi (Dede ve ark. 2000; Karsen ve ark. 2011). Oksidatif strese neden olarak hücre ve dokularda hasar oluşturan parazitlerden bir tanesi de *Toxoplasma gondii* olup yapılan bazı çalışmalarda, hayvanlarda (Al Kennany 2009) ve insanlarda (Karaman ve ark. 2008; Al Azzauy 2011) bu parazitin oluşturduğu oksidatif stresin hastalığın patogenezesinde rol oynadığı bildirildi. Yaptığımız çalışmada da toksoplazma ile enfekte koyunlarda TOK ve OSİ değerinin arttığı, TAK değerinin ise azaldığı belirlendi. Dolayısıyla da yukarıda bahsi geçen çalışmalarla elde ettiğimiz bulguların uyumlu olduğu görülmektedir. NO'nin üretildiği yere göre farklı fizyolojik rolleri bulunmaktadır. Bir nörotransmitter gibi davranma, kan basıncının düzenlenmesi gibi görevlerinin yanı sıra patojenlerle (virüs, bakteri, parazit) mücadelede de önemli bir moleküldür (Atakışı ve Merhan 2017). Chao ve ark. (1993) NO'nin mikroglial hücrelerde *Toxoplasma gondii*'nin çoğalmasının baskılanmasında anahtar bir role sahip olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ise kontrol grubu ile toksoplazmozisli koyunlar arasında NO düzeyinin arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi. Seruloplazmin bakırın taşınması, organik aminlerin oksidasyonu, hücrel demir düzeyinin düzenlenmesi ve feroksidaz aktivitesi gibi fonksiyonları bulunmaktadır (Healy ve Tipton 2007). Yapılan çalışmalarda oksijen radikallerinin etkilerini azaltarak hücreleri oksidatif zararlara karşı koruduğu ve antimikrobiyal gücü artırdığı bildirildi (Cerone ve ark. 2000, Bozukluhan ve ark. 2018). Çalışmada kontrol grubu ile toksoplazmozisli koyunlar arasında seruloplazmin düzeyinin arttığı ancak istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi.

Sonuç olarak, toksoplazmozisin koyunlarda oksidatif-antioksidatif kapasitede önemli değişikliklere neden olduğu belirlendi. Elde edilen bu bulgular özellikle hastalığıdaki yangı şiddetinin belirlenmesine ve tanısına katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

III. Uluslararası Avrasya Tarım ve Doğa Bilimleri Kongresinde poster olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

KAYNAKLAR

- Al- Kennany ER (2009). Oxygen free radicals released in placenta of ewes naturally infected with *Toxoplasma gondii*. *Al-Anbar J Vet Sci*, 2, 1-6.
- Al-Azzauy AAM (2011). Evaluation of erythrocyte malondialdehyde, glutathione concentration and serum nitric oxide levels in patients with *Toxoplasma gondii*. *Ibn Al-Haitham J For Pure&Appl Sci*, 24, 1-6.
- Atakışı E, Merhan O (2017). Nitric oxide synthase and nitric oxide involvement in different toxicities In: Nitric Oxide Synthase Simple Enzyme-Complex Roles. Saravi SSS (Ed), 197-214, InTech, Croatia.
- Atmaca N, Çınar M, Güner B, Kabakçı R, Gazyağcı AN, Atmaca HT, Canpolat S (2015). Evaluation of oxidative stress, hematological and biochemical parameters during *Toxoplasma gondii* infection in gerbils. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 165-170.
- Aydoğdu U, Coşkun A, Başbuğ O, Ağaoğlu ZT (2018). Parvoviral enteritisli köpeklerde total oksidan-antioksidan durum ile oksidatif stres indeksinin değerlendirilmesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 32, 161-164.
- Bozukluhan K, Atakışı E, Atakışı O (2013). Nitric oxide levels, total antioxidant and oxidant and capacity in cattle with foot-and-mouth-disease. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 19, 179-181.
- Bozukluhan K, Merhan O, Gökçe Hİ, Ögün M, Atakışı E, Kızıltepe Ş, Gökçe G (2018). Determination of some acute phase proteins, biochemical parameters and oxidative stress in sheep with naturally infected sheepox virus. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 24 (3), 437-441.

- Bozukluhan K, Merhan O, Ögün M, Cihan M, Gökçe G (2016). Omfalitisi Buzağlarda Bazı Oksidatif Stres Parametre Düzeylerinin Belirlenmesi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 30 (2), 79-81.
- Bozukluhan K, Merhan O, Özcan A, Gökçe Hİ, Gökçe G (2017). *Toxocara vitulorum* ile doğal enfekte buzağlarda serum haptoglobin düzeyi, oksidatif belirteçler ve bazı biyokimyasal parametrelerin düzeyinin belirlenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 64, 75-79.
- Can MF (2010). Küçük ruminantlarda toksoplazmoz'un hayvan sağlığı ekonomisi yönünden değerlendirilmesi. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 5, 167-174.
- Celi P, Gabai G (2015). Oxidant/antioxidant balance in animal nutrition and health: The role of protein oxidation. *Front Vet Sci*, 2, 1-13.
- Cerone SI, Sansinanea AS, Streitenberger SA, Garcia MC, Auza NJ (2000). Cytochrome C oxidase, Cu, Zn-superoxide dismutase, and ceruloplasmin activities in copper-deficient bovines. *Biol Trace Elem Res*, 73, 269-278.
- Chao CC, Anderson WR, Hu S, Gekker G, Martella A, Peterson PK (1993). Activated microglia inhibit multiplication of *toxoplasma gondii* via a nitric oxide mechanism. *Clin Immunol Immunopath*, 67 (2), 178-183.
- Colombo JP, Richterich R, (1964). Zurbestimmung des caeruloplasmin im plasma [on the determination of ceruloplasmin in plasma]. *Schweiz Med Wochenschr*, 94, 715-720.
- Dede S, Değer Y, Değer S, Alkan M (2000). Bazı endoparazitlerle (*Fasciola sp. + Trichostrongylidae sp. + Eimeria sp.*) enfekte koyunlarda lipid peroksidasyonu ve antioksidan durumunun saptanması. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 24(1), 190-193.
- Deveci HA, Kükürt A, Nur G, Alpaz M, Merhan O, Bozukluhan K, Yılmaz V, Karapehlivan M (2018). Serum paraoxonase activity and total sialic acid in sheep with foot and mouth disease. *Med Weter*, 74 (3), 199-202.
- Dubey JP, Jones JL (2008). *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int J Parasitol*, 38, 1257-1278.
- Erel Ö (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable abts radical cation. *Clin Biochem*, 37, 277-285.
- Erel Ö (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem*, 38, 1103-1111.
- Gültekin M, Paşa S, Ural K, Balıkcı C, Ekren Aşıcı GS, Gültekin G (2017). Visseral leishmaniasis'in farklı evrelerindeki köpeklerde oksidatif durum ve lipid profili. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 41, 183-187.
- Healy J, Tipton K (2007). Ceruloplasmin and what it might do. *J Neural Transm*, 114, 777-781.
- Hill DE, Chirukandath S, Dubey JP (2005). Biology and epidemiology of *Toxoplasma gondii* in man and animals. *Anim Health Res Rev*, 6, 41-61.
- Hökelek M, Açıcı M (2009). Toxoplasmosis In: Zoonozlar Hayvanlardan İnsanlara Bulaşan Enfeksiyonlar. Doğanay M, Altıntaş N (Ed), 803, Bilimsel Tıp Yayınevi, Türkiye.
- İssi M, Gul Y, Yılmaz S (2008). Clinical haematological and antioxidant status in naturally poxvirus infected sheep. *Rev Med Vet*, 159, 54-58.
- Karababa F, Yesilova Y, Turan E, Selek S, Altun H, Selek S (2013). Impact of depressive symptoms on oxidative stress in patients with psoriasis. *Redox Rep*, 18, 51-55.
- Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest Radikaller. *MAKÜ Sağ Bil Enst Derg*, 4(1), 50-59.
- Karaman U, Celik T, Kiran TR, Colak C, Daldal NU (2008). Malondialdehyde, glutathione, and nitric oxide levels in *Toxoplasma gondii* seropositive patients. *Korean J Parasitol*, 46, 293-295.
- Karsen H, Sünnecioglu M, Ceylan RM, Bayraktar M, Taşkın A, Aksoy N, Erten R (2011). Evaluation of oxidative status in patients with *Fasciola hepatica* infection. *African Health Sci*, 11, 14-18.
- Kozan E, Avcı G, Kırcalı SF, Birdane FM, Köse M (2010). Askaridiazisli ve tedavi edilmiş köpeklerde antioksidan düzeylerinin ve bazı biyokimyasal parametrelerinin incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 57, 93-97.
- Merhan O, Bozukluhan K, Gokce HI (2017a). Acute phase proteins and biochemical and oxidative stress parameters in *Hypoderma spp.* infested cattle. *J Hellenic Vet Med Soc*, 68, 535-540.
- Merhan O, Bozukluhan K, Kuru M, Büyüf F, Özden Ö, Kükürt A (2017b). Investigation of oxidative stress index and lipid profile in cattle with Brucellosis. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 23 (6), 933-937.
- Miranda KM, Espey MG, Wink DA (2001). A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62-71.
- Özel MA (2013). Veteriner Hekimliğinde Parazit Hastalıkları. 1. Baskı, Meta Basım, İzmir.
- Özmutlu Çakmak D, Karatepe B (2017). Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep from Nevşehir province in Turkey. *Türkiye Parazitoloj Derg*, 41, 148-151.

Süleyman H, Gül V, Erhan E (2018). Oksidatif stres ve doku hasarı. *Erzincan Tıp Derg.* 1(1), 1-4.

Tabakoğlu E, Durgut R (2013). Veteriner hekimlikte oksidatif stres ve bazı önemli hastalıklarda oksidatif stresin etkileri. *AVKAE Derg.* 3, 69-75.

Varlı C, Türköz İ, Aydemir S, Emre S, Şimşek F, Yıldırım MT (2016). Toksoplazmoz, *Okmeydanı Tıp Derg.* 32, 24-28.

Zhou P, Chen Z, Li HL, Zheng H, He S, Lin RQ, Zhu XQ (2011). Toxoplasma gondii infection in humans in China. *Parasites&Vectors.* 4, 165.



Protective Effects of Silymarin on Brain Injury in Rats

İbrahim AKTAŞ¹ Murat SEVİMLİ²

¹ Adıyaman University, School of Health Services, Department of Pharmacology, Adıyaman, Turkey

² Süleyman Demirel University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology, Isparta, Turkey

Received: 11.12.2019

Accepted: 17.04.2020

ABSTRACT

In this study, we evaluated the possible protective effects of silymarin on valproic acid-induced brain injury by histological and biochemical parameters in rats. The experiment was performed with 21 Sprague Dawley male rats. Rats were divided into three groups: group 1 control, group 2 valproic acid and group 3 valproic acid + silymarin. The groups received valproic acid 500 mg/kg/day and silymarin 100 mg/kg/day for 14 days except the control group. Increased serum glucose, cholesterol, triglyceride and creatine kinase BB levels with valproic acid were reversed with silymarin administration. Also, increased malondialdehyde and decreased glutathione levels in brain tissue with valproic acid were significantly suppressed by silymarin. In the valproic acid + silymarin group, oxidative stress was decreased, antioxidant activity was increased and histopathological changes were decreased compared to the valproic acid group. Brain injury caused by valproic acid was attenuated by silymarin treatment owing to the antioxidative and anti-apoptotic effects of silymarin. Silymarin may be useful for reducing the severity of valproic acid induced brain damage.

Keywords: Brain damage, Rat, Silymarin, Valproic acid

ÖZ

Sıçanlarda Silimarinin Beyin Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi

Bu çalışmada silimarin'in sıçanlarda histolojik ve biyokimyasal parametrelerle valproik asite bağlı beyin hasarı üzerindeki olası koruyucu etkilerini değerlendirdik. Deney 21 Sprague Dawley erkek sıçan ile yapıldı. Sıçanlar üç gruba ayrıldı: grup 1 kontrol, grup 2 valproik asit ve grup 3 valproik asit + silimarin. Gruplara kontrol grubu dışında 14 gün boyunca 500 mg/kg/gün valproik asit ve 14 gün boyunca 100 mg/kg silimarin verildi. Valproik asit ile artmış serum glikoz, kolesterol, trigliserit ve kreatin kinaz BB seviyeleri, silimarin uygulaması ile tersine çevrildi. Ayrıca, valproik asitle beyin dokusunda artmış malondialdehit ve azalmış glutatyon düzeyleri, silimarin ile anlamlı önemli ölçüde baskılanmıştır. Valproik asit + silimarin grubunda oksidatif stres azaldı, antioksidan aktivite arttı ve valproik asit grubuna göre histopatolojik değişiklikler azaldı. Valproik asidin neden olduğu beyin hasarı, silimarin'in antioksidatif ve anti-apoptotik etkileri nedeniyle silimarin tedavisi ile azaltıldı. Silimarin, valproik asite bağlı beyin hasarının şiddetini azaltmak için yararlı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Beyin hasarı, Sıçan, Silimarin, Valproik asit

INTRODUCTION

The formation of reactive oxygen species (ROS) in the brain is a precursor of psychiatric disorders. Because of the brain uses the highest amount of oxygen compared to other body organs, it is very sensitive to oxidative stress. In addition, it produces high amounts of ROS due to its high aerobic metabolism (Nazıroğlu and Yürekli 2013). High amounts of ROS can be important mediators of cell impairment in various structures such as proteins, lipids, nucleic acids, and can alter normal signaling pathways by stimulating redox-sensitive transcription agents (Cárdenas-Rodríguez et al. 2013; Emekli-Alturfan et al. 2015). The role of oxidative stress in the formation of central nervous system (CNS) diseases is well known. This

brain contains a large number of oxidized fatty acids and a small number of antioxidant systems. The term epilepsy refers to a group of adult and children disorders characterized by chronic, recurrent, and paroxysmal changes of motor and sensory neurological functions secondary to a disturbance in the electrical activity of a neuron population (Cárdenas-Rodríguez et al. 2013). The onset and progression of epilepsy is caused by free oxygen radicals (Nazıroğlu and Yürekli 2013). Valproic acid (VPA) is used to treat epileptic seizures but also has therapeutic potential in other nervous system diseases such as migraine, manic depression and bipolar disorder (Gynther et al. 2016; Palsamy et al. 2014). VPA binds extensively to plasma proteins, causing serious non-target adverse effects and possible drug-drug interactions (Gynther et al.



2016). ROS, which occurs as a side-effect in VPA application, can directly damage cellular macromolecules such as DNA, protein, lipids and change the normal signal paths by activation of redox sensitive transcription factors (Emekli-Alturfan et al. 2015). The increased ROS blocks sodium and calcium channels and acts by increasing the function of the inhibitory neurotransmitter gamma aminobutyric acid (GABA). This effect results in a decrease in neuronal activity, an increase in apoptotic cell death in neocortex and a decrease in cell proliferation in ganglionic excretion. In addition, it reduces the proliferation of neuroblastoma cells and neural progenitor cells, and induces apoptosis in microglial cells (Eckert et al. 2017; Kataoka et al. 2013).

Phytochemicals and plant-based products are widely used in the treatment of various neurological disorders because of their safety and lack of side effects (Kumburovic et al. 2019). Silymarin (SLY) is a flavonoid obtained from the seeds of milk thistle (*Silybum marianum*) and widely used as a hepatoprotective agent (Abdelsalam et al. 2019; Gabrielová et al. 2019). SLY has anti-inflammatory, immunomodulator, antifibrotic, antioxidant, metal chelator (iron), protein synthesis stimulant and neuroprotective effects (Gabrielová et al. 2019; Muthumani and Prabu 2014). The SLY is particularly effective in protecting against the effects of inflammatory and oxidative stress caused by neurodegenerative diseases (Borah et al. 2013; Di Costanzo and Angelico 2019). SLY can cross the blood-brain barrier, increase antioxidant enzyme activity and reduce lipid peroxidation levels in erythrocytes exposed to hydrogen peroxide. In addition, SLY supplementation reduces protein oxidation in the cortex and hippocampus of the rat's brain (Yön et al. 2019). SLY acts as a free radical scavenger, removes reactive toxic radicals from oxidative detoxification of xenobiotics and prevents lipid peroxidation (Zhou et al. 2004). SLY has also been reported to be very effective in reducing insulin fibril-induced neuronal toxicity characterized with decreased cell viability, lactate dehydrogenase release, increased intracellular ROS, morphological changes and apoptotic cell death (Katebi et al. 2018). SLY binds to receptors in membranes thus prevents toxins from binding, reduces drug-induced damage, reacts with ROS, converts them to less reactive compounds, enhances the effects of antioxidants GSH (glutathione) (Beydilli et al. 2015; Rašković et al. 2011).

The study was conducted to investigate the preventive effects of SLY against VPA-induced brain damage by evaluating biochemical and histopathological changes.

MATERIALS and METHODS

Chemicals

VPA and SLY were purchased from Liba Co (Turkey) and Madaus (Turkey). Hydrochloric acid (HCL), thiochloroacetic acid (TCA), thiobarbuturic acid (TBA) and paraffin were obtained from, Sigma-Aldrich (USA). Xylene, hematoxylin-eosin and ethanol were obtained from Merck (Germany). All other chemicals were the best analytical grade and were purchased from Sigma.

Animals

In this study 21 male Sprague-Dawley rats (220-250g, for 8 weeks) were obtained from Adiyaman University Experimental Animal Production Application and Research Center and the study was conducted at the same place. Ethics committee report; it was obtained from the Laboratory Animals Ethics Committee (Protocol 2019/08)

of Firat University Faculty of Medicine and the study was conducted according to this protocol.

Treatment protocol

The animals were randomised into three groups, with seven rats in each group, as follows: Control; VPA; VPA + SLY. The control group received 0.5 mL saline i.p. and 1 mL saline orally for 14 days. VPA group received 500 mg/kg/day VPA p.o. for 14 days (Tong et al. 2005). VPA + SLY group received 500 mg/kg/day VPA p.o. and 100 mg/kg/day SLY p.o. for 14 days (Beydilli et al. 2015). Rats were sacrificed by cervical dislocation under anesthesia with ethyl ether at the end of day 14. Blood samples were collected from the jugular vein, centrifuged at 5,000 x g for 15 minutes, and serum was collected and stored at -86 °C for biochemical analysis. The brain was excised and stored at -86 °C until analysis.

Biochemical evaluation

Serum biochemical parameters glucose mg/dL, cholesterol mg/dL, triglyceride (TG) mg/dL and creatine kinase BB (CK BB) mg/dL) were analyzed according to Reitman-Frankel colorimetric transaminase method on Olympus 2700 analyzer at the University of Adiyaman (Olympus Diagnostica GmbH, Hamburg, Germany) (Crowley 1967).

Oxidative stress biomarkers

Malondialdehyde (MDA) measurements were made in brain tissue. Two volumes of sample and two volumes of stock solution (0.375% thiobarbituric acid in 0.25 N HCl and 15% trichloroacetic acid) were mixed in the centrifuge tube. The solution was heated for 15 minutes in boiling water and then cooled. The residue was centrifuged at 2500 x g for 10 minutes and samples were read by spectrophotometer at a wavelength of 532 nm (Placer et al. 1966).

GSH levels in brain tissues were determined according to Sedlak and Lindsay method (Sedlak and Lindsay 1968). The sample was eluted with 50% TCA and centrifuged at 1000 x g for 5 minutes. 2 mL Tris-EDTA buffer (0.2 M, PH = 8.9) and 0.1 mL 0.01 M 5,5'-dithio-bis-2 by taking 0.5 mL of the supernatant from the supernatant-nitrobenzoic acid was added. The mixture sample was allowed to stand at room temperature for 5 minutes and read by spectrophotometer at 412 nm wavelength.

Histopathological examinations

The brain tissues taken from animals were fixed in 10% neutral formalin solution. After fixation tissues were washed overnight in running water. These washed samples were dehydrated with ethanol, cleared with xylene and embedded in paraffin. 4-5 µm thick sections were taken from the paraffin blocks (RM2125RTS, Leica, Germany). The samples from all groups were stained with hematoxylin & eosin for histopathological evaluation. The histopathological findings were evaluated under these parameters; neuronal structure (nuclear and cytoplasm properties) and neuroglial changes (number and morphology). Histopathological scoring was performed in terms of apoptotic (dense eosinophilic cytoplasm, picnotic nucleus, apoptotic bodies) and regenerative findings (reduction in apoptotic cell count, neuroglial aggregation, large neuroglial cells with vesicular nuclei) by examining different areas in 40x objective from each section. According to the grade of the findings (-): no findings, (+): low level, (++) : moderate level, (+++) : severe level. Samples were evaluated and imaged by imaging binocular light microscopy (ECLIPSE Ni-U, Nikon and Tokyo, Japan). (Mostafa et al. 2017)

Statistical analysis

SPSS version 20.0 was used for statistical analysis. Shapiro-Wilk test was used to evaluate normality. One-way ANOVA and post-hoc, LSD were applied for in-group comparisons of parametric data; Kruskal Wallis test was used for non-parametric of biochemical data. The same test was also used for semi-qualified evaluation of histopathological scores and for differences in the data measured between the groups. Mann-Whitney *U* test was used to compare the two groups. Data were considered statistically significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS

Biochemical evaluation

Glucose, cholesterol, TG and CK BB levels were significantly increased in VPA group compared to control and VPA + SLY groups. SLY therapies resulted in a significant decrease in VPA-induced glucose, cholesterol, TG and CK BB levels (Table 1).

Oxidative stress biomarkers

According to the data in Table 1, significantly higher MDA level and significantly lower GSH levels were detected in the VPA group. SLY treatments resulted in a significant decrease in MDA level and a significant increase in GSH level.

Histopathological results

As shown Table 2 and Figure 1, examination of sections from control group showed normal neuronal structure. The staining characteristics of nucleosus-cytoplasm and morphology of neurons was normal. Also neuroglial cells were in normal number and morphology (Fig. 1 A, B). In VPA group there were significant pathological changes; many apoptotic bodies and apoptotic neurons/neuroglial cells with dense eosinophilic cytoplasm and picnotic nuclei (Fig. 1 C, D). Compared to the VPA group, a significant improvement was observed in histopathological findings in the VPA + SLY group. In sections of VPA + SLY group, neuroglial cell clusters and neuroglial cells with large vesicular nuclei were observed as a sign of regeneration with decreased number of apoptotic cells (Fig. 1 E, F).

Table 1. Serum biochemical and tissue oxidative stress biomarkers in brain of experimental groups

	Control	VPA	VPA + SLY
Serum biochemical biomarkers			
Glucose (mg/dL)	123.14 ± 1.58 ^b	145.29 ± 1.26 ^{a,c}	125.14 ± 1.20 ^b
Cholesterol (mg/dL)	50.00 ± 1.29 ^b	65.00 ± 1.54 ^{a,c}	51.86 ± 0.50 ^b
Triglyceride (mg/dl)	70.00 ± 1.19 ^{b,c}	11.43 ± 1.51 ^{a,c}	80.00 ± 0.81 ^{a,b}
Creatine Kinase-BB (mg/dL)	24.71 ± 1.01 ^b	64.71 ± 1.71 ^{a,c}	28.29 ± 2.36 ^b
Heart tissue oxidative stress biomarkers			
GSH (nmole/mg)	130.00 ± 2.44 ^{a,b}	70.00 ± 2.52 ^{a,c}	121.43 ± 2.68 ^{a,b}
MDA (nmole/mg tissue)	39.71 ± 2.45 ^{b,c}	171.43 ± 2.54 ^{a,c}	120.02 ± 2.67 ^{a,b}

Each group represents the mean ± SEM for seven rats. a: Significant from Control; b: Significant from VPA; c: Significant from VPA + SLY. Abbreviations: VPA; Valproic acid; SLY; Silymarin, CK-BB; Creatine kinase BB, GSH; Glutathione, MDA; Malondialdehyde. VPA: 500 mg/kg VPA, VPA + SLY: 500 mg/kg VPA + 100 mg/kg SLY.

Table 2. Histopathological scoring of brain sections of experimental groups

Parameters/scores	Control	VPA	VPA+SLY
Apoptotic Findings			
- dense eosinophilic cytoplasm	-	+++ ^a	++ ^b
- picnotic nucleus	-	+++ ^a	++ ^b
- apoptotic bodies	-	+++ ^a	++ ^b
Regenerative Findings			
- reduction in apoptotic cell count	-	- ^a	+++ ^b
- neuroglial aggregation	-	- ^a	+++ ^b
- large neuroglial cells with vesicular nuclei	-	- ^a	+++ ^b

In according to modified semi-quantitative scale for the evaluation of histopathological changes; (0): none, (1): mild, (2): moderate, (3): severe grade (n = 7). VPA, valproic acid; SLY, silymarin; a: VPA increased brain damage, $p < 0.05$ vs. control group. b: SLY reduced brain damage, $p < 0.05$ vs. VPA group

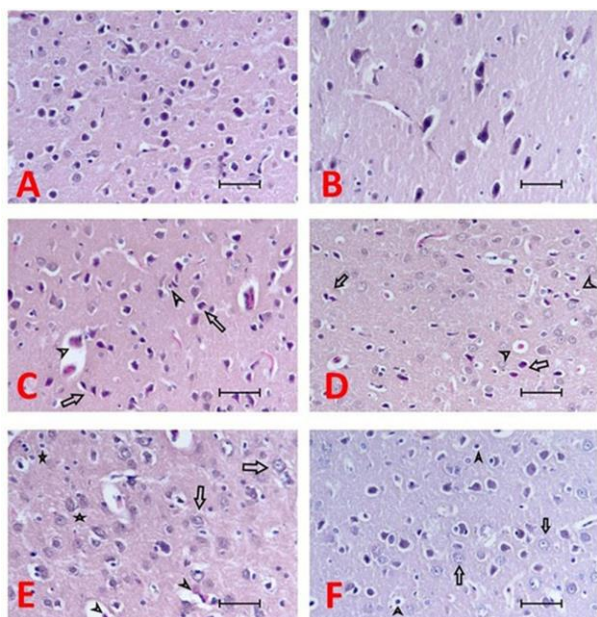


Figure 1. Rat brain tissue section. A-B; Control group; normal histological appearance is observed in brain tissue sections. C-D; VPA given to the group; Many apoptotic cells (arrows) and apoptotic bodies (arrowheads) are seen in different cortex tissue regions of the brain. E-F; VPA + SLY given group; A small number of apoptotic cells (arrowheads), a large number of large vesicular neuroglial cells (arrows) and neuroglial clusters are observed in sections of SLY group (asterisk). Showed decrease of histopathological findings compared to VPA group (H-E, Scale bar 50 μ m, x400)

DISCUSSION

Brain tissue is exposed to neuronal death because of ROS-induced damage due to its high oxidative metabolism and less antioxidant defense system than other organs (Demirel Yılmaz 2019; Nazıroğlu and Yürekli 2013). Oxidative stress, because of this cycle, plays an important role in the pathophysiology of epilepsy. Increased free radicals and decreased GSH concentrations have been reported in membrane lipid peroxidation in the epileptic focus. Increasing evidences suggest that long-term antiepileptic drug therapy leads to increased oxidative stress. For example, VPA has been reported to increase lipid peroxidation and thus cause brain damage in long-term users (Chaudhary and Parvez 2018; Nazıroğlu and Yürekli 2013). Indeed, VPA has been reported to exacerbate the death of cerebellar granular neurons, induce cognitive impairment in various neuronal cell populations and reduce the proliferation of hippocampal neurons that induce apoptosis (Bollino et al. 2015). To date, different antioxidant agents have been used to decrease the toxic effect of VPA. However, there is little data on the protective effect of SLY on VPA-induced brain injury. It has been reported that SLY plays a role in the protection of neurons against oxidative stress and has a direct effect on neuronal oxidant status. SLY has been reported to balance oxidative stress and neurotoxicity by increasing the activity of both enzymatic and non-enzymatic antioxidant markers.

In addition, SLY has been reported to be protective against oxidative insults by potentially inhibiting the formation of oxygen and peroxy radicals along with protein oxidation products in the cortices of the elderly rodent brain. In another study, it was reported that application of SLY

increases respiratory activity and inhibits lipid peroxidation in brain mitochondria (Borah et al. 2013). According to recent studies, SLY has been reported to react with ROS as an antioxidant to form less reactive and toxic compounds and to increase resistance to harmful effects by interacting with cell membranes (Rašković et al. 2011). As a result, SLY acts primarily as an antioxidant, reduces ROS and lipid peroxidation and increases endogenous antioxidant enzyme concentrations (de Avelar et al. 2017).

An increase in biochemical parameters suggests that 4-en-VPA and its β -oxidation products trigger a series of reactions that result in accumulation (Abdel-Dayem et al. 2014). Serum glucose level increased slightly with VPA administration, which approached normal with SLY administration. In a study of 25 patients, a significant reduction in blood sugar levels occurred after four months of treatment with 200 mg SLY three times a day before meals (Huseini et al. 2006). This study is compatible with our study. It was seen that total serum cholesterol levels which were reported to be increased by VPA were then lowered by SLY. SLY applies antioxidant and membrane stabilizing activity. This effect contains important properties for uptake of plasma lipoproteins and thus changes in lipid metabolism. In addition, SLY has been reported to have a direct effect on cholesterol metabolism by inhibiting a reductase enzyme, 3-hydroxy 3-methylglutaryl CoA, involved in cholesterol synthesis (Metwally et al. 2009; Neha et al. 2014). In a study, Metwally et al. (2009) lowered the level of cholesterol in proportion to SLY in rats fed high-cholesterol diet. The cholesterol lowering effect of SLY parallels our study. Increased TG levels with VPA were reversed with SLY and our study is consistent with the literature. VPA-induced high TG level may be attributed to inhibition of endothelial lipoprotein lipase activity responsible for the hydrolysis of TG. In a study of rats, Ali et al. (2019) shows that giving FRAL (fructose (10%) in drinking water plus AlCl₃ (34 mg/kg/day)) significantly increased serum TG level to normal rats. FRAL + SLY (100 mg/kg/day) per oral gavage administration resulted in a significant decrease in serum TG level compared to FRAL + SLY. The results obtained in this study are parallel to the effect of SLY on TG.

CK-BB is a creatine-kinase isoform found in CNS. This enzyme catalyzes the transfer of phosphate groups from ATP to creatine phosphate, so it plays a role in energy transfer in tissues with large energy demands, such as the brain. Inside the CNS, CK-BB is found in astrocytes and is therefore released when there is brain tissue damage. Serum CK-BB levels have been found to be high in a variety of brain injury environments, including cardiac arrest or subarachnoid hemorrhage (Sharma et al. 2017). Because of VPA application, CK-BB level was increased. This may be due to impaired energy transfer due to accumulation of VPA in the brain. With the SLY application, the situation is reversed.

GSH is an endogenous antioxidant which is mainly present in reduced form in cells. It reacts with free radicals and inactivates them and their most toxic form, hydroxyl radicals, in oxidized form (Agarwalet al. 2011). In our study, we found a significant decrease in GSH levels as a result of oxidative stress caused by VPA application. It caused the depletion of antioxidants (GSH) in neuronal cells because of cellular redox formation and endogenous ROS accumulation created by VPA. In addition, neurotoxicity develops by increasing the sensitivity of the neuronal plasma membrane to free radical attacks (Chaudhary and Parvez 2018). Wu et al. (2017) in the study of pregnant rats, embryonic day 12.5 ip 600 mg/kg

VPA single dose exposure females. SLY increased ROS scavenging activity, cellular content of GSH, and membrane stability. The decreasing GSH level increased with SLY due to the effect of the oxidative stress formed by I/R. These study compatibles with our study (Moghaddam et al. 2020).

Lipid peroxidation is the process that involves chain reactions of free radicals with polyunsaturated fatty acids. These reactions lead to hydroperoxide formation and lipid cleavage into low molecular weight fragments. MDA is a large reactive aldehyde resulting from the peroxidation of biological membrane-polyunsaturated fatty acids. Therefore, it is used as an indicator of tissue damage, which includes a series of chain reactions (Wu et al. 2017). Gao et al. (2016), in their study, observed high MDA because of increased oxidative stress in the brain of VPA-induced rat pups. In this toxicity, high ROS in the neurons of the hippocampus and cerebral cortex are signs of tissue damage and reduced antioxidant protection mechanisms. In another study, SLY increased the activity of enzymes that neutralize lipid peroxidation and decreased the level of MDA to normal values (Zhu et al. 2014).

There are various data indicating that VPA, which is widely used as an anticonvulsant agent, causes neurodegeneration in long term uses. Especially VPA has been shown to cause serious problems including coma and cerebral edema due to neurotoxic effects on the central nervous system (Camilleri et al. 2005). In accordance with these data, both *in vitro* and *in vivo* studies reveal neurodegeneration caused by VPA (Fujiki et al. 2013; Jin et al. 2005). In our study, histopathological examinations in the brain tissue were carried out for the detection of neurodegenerative and regenerative findings. When the sections belonging to the treatment groups were examined, as a result of the effect of SLY, the presence of findings that could be evaluated in favor of regeneration (neuroglial clustering, large neuroglial cells with vesicular nuclei) was observed with the decrease in the findings of apoptotic neurodegeneration. These data show that histopathologically, VPA causes apoptotic neurodegeneration and SLY leads to an improvement in apoptotic neurodegeneration findings.

Free radicals and oxidative stress have an important place among the possible mechanisms of VPA in apoptotic neurodegeneration (Zhang et al. 2010). There are many studies showing that oxidative stress is responsible for various neurodegenerative diseases and also demonstrating the neuroprotective effects of various antioxidants (Chaudhary and Parvez 2018). When histopathological findings are evaluated together with other results, it is seen that VPA causes an apoptotic neurodegeneration caused by oxidative stress and SLY causes a decrease in these findings with antioxidant effects.

CONCLUSION

Treatment with SLY inhibited VPA induced brain dysfunction and histopathological changes significantly. The antioxidant and anti-apoptotic activities of SLY appear to be responsible for its brain protective effect. Therefore, SLY may useful for attenuation or prevention of the complications of VPA induced brain injury in clinical practice.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Abdel-Dayem MA, Elmarakby AA, Abdel-Aziz AA, Pye C, Said SA, El-Mowafy AM (2014). Valproate-induced liver injury: modulation by the omega-3 fatty acid DHA proposes a novel anticonvulsant regimen. *Drugs R D*, 14(2), 85-94.
- Abdelsalam HM, Samak MA, Alsemeh AE (2019). Synergistic therapeutic effects of Vitis vinifera extract and Silymarin on experimentally induced cardiorenal injury: The pertinent role of Nrf2. *Biomed Pharmacother*, 110, 37-46.
- Agarwal NB, Agarwal NK, Mediratta PK, Sharma KK (2011). Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. *Seizure*, 20(3), 257-62.
- Ali NM, Mahmoud AAA, Mahmoud MF, El Fayoumi HM (2019). Glycyrrhizic acid and silymarin alleviate the neurotoxic effects of aluminum in rats challenged with fructose-induced insulin resistance: possible role of toll-like receptor 4 pathway. *Drug Chem Toxicol*, 42(2), 210-9.
- Beydilli H, Yilmaz N, Cetin ES et al. (2015). Evaluation of the protective effect of silibinin against diazinon induced hepatotoxicity and free-radical damage in rat liver. *Iran Red Crescent Med J*, 17 (4), 1-7.
- Bollino D, Balan I, Aurelian L (2015). Valproic acid induces neuronal cell death through a novel calpain-dependent necroptosis pathway. *J Neurochem*, 133(2), 174-86.
- Borah A, Paul R, Choudhury S et al. (2013). Neuroprotective potential of silymarin against CNS disorders: Insight into the pathways and molecular mechanisms of action. *CNS Neurosci Ther*, 19(11), 847-53.
- Camilleri C, Albertson T, Offerman S (2005). Fatal cerebral edema after moderate valproic acid overdose. *Ann Emerg Med*, 45(3), 337-8.
- Cárdenas-Rodríguez N, Coballase-Urrutia E, Rivera-Espinosa L et al. (2013). Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): Evidence in humans and experimental models. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 598-493.
- Chaudhary S, Parvez S (2018). Valproic acid induced neurotoxicological manifestations and its mitigation by melatonin in rat brain synaptosomes. *Arch Med Res*, 49(7), 441-50.
- Crowley LV (1967). The reitman-frankel colorimetric transaminase procedure in suspected myocardial infarction. *Clin Chem*, 13(6), 482-7.
- de Avelar CR, Pereira EM, de Farias Costa PR, de Jesus RP, de Oliveira LPM (2017). Effect of silymarin on biochemical indicators in patients with liver disease: Systematic review with meta-analysis. *World J Gastroenterol*, 23(27), 5004-17.
- Demirel Yılmaz B, Eren B, Sağır D, Eren Z, Başardı Gökçe A (2019). Stereological examination of curcumin's effects on hippocampal damage caused by the anti-epileptic drugs phenobarbital and valproic acid in the developing rat brain. *Acta Histochem*, 121(4), 430-6.
- Di Costanzo A, Angelico R (2019). Formulation strategies for enhancing the bioavailability of silymarin: The state of the art. *Molecules*, 24(11), 1-29.
- Eckert M, Klumpp L, Huber S (2017). Cellular effects of the antiepileptic drug valproic acid in glioblastoma. *Cell Physiol Biochem*, 44(4), 1591-605.
- Emekli-Alturfan E, Alev B, Tunali S et al. (2015). Effects of edaravone on cardiac damage in valproic acid induced toxicity. *Ann Clin Lab Sci*, 45(2), 166-72.
- Fujiki R, Sato A, Fujitani M, Yamashita T. (2013). A proapoptotic effect of valproic acid on progenitors of embryonic stem cell-derived glutamatergic neurons. *Cell death & disease*, 4(6), 677-87.
- Gabrielová E, Zholobenko AV, Bartošiková L, Nečas J, Modriansky M (2015). Silymarin constituent 2,3-dehydrosilybin triggers reserpine-sensitive positive inotropic effect in perfused rat heart. *PLoS One*, 10(9), 1-15.
- Gao J, Wang X, Sun H et al. (2016). Neuroprotective effects of docosahexaenoic acid on hippocampal cell death and learning and memory impairments in a valproic acid-induced rat autism model. *Int J Dev Neurosci*, 49, 67-78.
- Gynther M, Peura L, Vernerová M et al. (2016). Amino acid promoieties alter valproic acid pharmacokinetics and enable extended brain exposure. *Neurochem Res*, 41(10), 2797-809.
- Huseini HF, Larjani B, Heshmat R et al. (2006). The efficacy of Silybum marianum (L.) Gaertn. (silymarin) in the treatment of type II diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *Phytother Res*, 20(12), 1036-9.
- Jin N, Kovács AD, Sui Z, Dewhurst S, Maggirwar SB (2005). Opposite effects of lithium and valproic acid on trophic factor deprivation-induced glycogen synthase kinase-3 activation, c-Jun expression and neuronal cell death. *Neuropharmacology*, 48(4), 576-83.
- Kataoka S, Takuma K, Hara Y, Maeda Y, Ago Y, Matsuda T (2013). Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation

- in mice treated prenatally with valproic acid. *Int J Neuropsychopharmacol*, 16(1), 91-103.
- Katebi B, Mahdavimehr M, Meratan AA, Ghasemi A, Nemat-Gorgani M (2018)**. Protective effects of silibinin on insulin amyloid fibrillation, cytotoxicity and mitochondrial membrane damage. *Arch Biochem Biophys*, 659, 22-32.
- Kumburovic I, Selakovic D, Juric T et al. (2019)**. Antioxidant effects of *satureja hortensis* L. attenuate the angiogenic effect of cisplatin in rats. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 1-15.
- Metwally MAA, El-Gellal AM, El-Sawaisi SM (2009)**. Effects of Silymarin on Lipid Metabolism in Rats. *World Applied Sciences Journal*, 6 (12), 1634-7
- Moghaddam AH, Mokhtari Sangdehi SR, Ranjbar M, Hasantabar V (2020)**. Preventive effect of silymarin-loaded chitosan nanoparticles against global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Eur J Pharmacol*, 3, 877-86.
- Mostafa HE, Alaa-Eldin EA, El-Shafei DA, Abouhashem NS (2017)**. Alleviative effect of licorice on copper chloride-induced oxidative stress in the brain: biochemical, histopathological, immunohistochemical, and genotoxic study. *Environ Sci Pollut Res Int*, 24(22), 18585-95
- Muthumani M, Prabu SM (2014)**. Silibinin potentially attenuates arsenic-induced oxidative stress mediated cardiotoxicity and dyslipidemia in rats. *Cardiovasc Toxicol*, 14(1), 83-97.
- Naziroğlu M, Yürekli, VA (2013)**. Effects of antiepileptic drugs on antioxidant and oxidant molecular pathways: Focus on trace elements. *Cell Mol Neurobiol*, 33(5), 589-99.
- Neha, Kumar A, Jaggi AS, Sodhi RK, Singh N (2014)**. Silymarin ameliorates memory deficits and neuropathological changes in mouse model of high-fat-diet-induced experimental dementia. Naunyn Schmiedebergs. *Arch Pharmacol*, 387(8), 777-87.
- Palsamy P, Bidasee KR, Shinohara T (2014)**. Valproic acid suppresses Nrf2/Keap1 dependent antioxidant protection through induction of endoplasmic reticulum stress and Keap1 promoter DNA demethylation in human lens epithelial cells. *Exp Eye Res*, 121, 26-34.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC (1966)**. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*, 16(2), 359-64.
- Rašković A, Stilinović N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M (2011)**. The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules*, 16(10), 8601-13.
- Sedlak J, Lindsay RH (1968)**. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem*, 25(1), 192-205.
- Sharma R, Rosenberg A, Bennett ER, Laskowitz DT, Acheson SK (2017)**. A blood-based biomarker panel to risk-stratify mild traumatic brain injury. *PLoS One*, 12(3), e0173798.
- Tong V, Teng XW, Chang TKH, Abbott FS (2005)**. Valproic acid I: Time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Toxicol Sci*, 86(2), 427-35.
- Wu H, Wang X, Gao J et al. (2017)**. Fingolimod (FTY720) attenuates social deficits, learning and memory impairments, neuronal loss and neuroinflammation in the rat model of autism. *Life Sci*, 173, 43-54.
- Yön B, Belviranlı M, Okudan N (2019)**. The effect of silymarin supplementation on cognitive impairment induced by diabetes in rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 30(4), 1-9.
- Zhu SY, Dong Y, Tu J, Zhou Y, Zhou XH, Xu B (2014)**. Silybum marianum oil attenuates oxidative stress and ameliorates mitochondrial dysfunction in mice treated with D-galactose. *Pharmacogn Mag*, 10, 92-9.
- Zhou S, Lim LY, Chowbay B (2004)**. Herbal Modulation of P-Glycoprotein. *Drug Metab Rev*, 36(1), 7-104.
- Zhang B, Wang X, Nazarali AJ (2010)**. Ascorbic acid reverses valproic acid-induced inhibition of *hoxa2* and maintains glutathione homeostasis in mouse embryos in culture. *Cell Mol Neurobiol*, 30(1), 137-48.



The Effects of Enzyme Addition Into the Ration Consisting of Different Levels of Pea on Laying Hens's Performance

Nuriye Tuğba BİNGÖL¹  Mehmet Akif KARSLI²  Selçuk ALTAÇLI¹ 
Çağrı KALE¹  Duran BOLAT¹ 

¹ Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department Of Animal Nutrition And Nutritional Diseases, Van, Turkey

² Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department Of Animal Nutrition And Nutritional Diseases, Kırıkkale, Turkey

Received: 03.12.2019

Accepted: 06.03.2020

ABSTRACT

This experiment was carried out to determine the effects of substituting protein coming from soybean-meal at different levels with protein coming from pea and enzyme addition into diets containing from pea on performance and egg quality criteria in laying hens. The experiment was carried out with 30-week-old hens. Seven treatment groups, including control group, with 7 sub-groups that contained of 7 laying hens at each groups were established. A total of 343 laying hens were utilized in the study. Egg weight was significantly lower in hens fed diet containing 10% pea (D1) protein compared with the other groups at the end of the experiment ($P < 0.05$). Yields of eggs per week were similar among groups, except 1. and 4.th weeks of the experiment, including last week. In general, feed intakes were also similar among groups, except 5.th week of experiment. Feed conversion ratios did not differ among groups, but were different at first week of experiment. Diameter and shape indexes among egg quality criteria were statistically similar but white indexes, Haugh unit, color scale and shell thickness were significantly different among groups ($P < 0.05$). In conclusion, substituting protein coming from soybean meal with protein coming from pea up to 30% with or without enzyme addition had no any negative effects on performance of laying hens. Especially, egg quality indexes such as white indexes Haugh unite and egg yolk significantly improved with substation of soybean meal with pea with addition of enzyme at 20 and 30%.

Keywords: Laying hens, Pea, Performance, Egg quality criteria

ÖZ

Farklı Düzeylerde Bezelye Katılan Yumurta Tavuğu Rasyonlarına Enzim İlavesinin Performans Üzerine Etkileri

Bu çalışma, yumurtacı tavuk rasyonlarına soya küspesi yerine farklı düzeylerde bezelye ve bezelyeye ek olarak enzim ilavesinin performans ve yumurta kalite kriterleri üzerine etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır. Deneme 30 haftalık yaşta yumurtacı tavuklarda gerçekleştirilmiştir. Deneme, bir kontrol ve 6 muamele grubu olmak üzere 7 gruptan, her grup 7 alt gruptan ve her alt grup da 7 yumurta tavuğundan oluşturulmuştur. Toplam 343 yumurta tavuğu kullanılmıştır. Araştırma sonunda yumurta ağırlığının %10 bezelye (D1) olan grupta diğer gruplara göre önemli derecede düşük olduğu görülmüştür ($P < 0.05$). Yumurta verimleri bakımından 1 ve 4. hafta dışında son hafta da dahil olmak üzere gruplar arasında farklılık görülmemiştir. Yem tüketiminde 5. haftada gruplar arasında farklılık görülmekle beraber, genel olarak diğer haftalarda herhangi bir farklılık belirlenmemiştir. Yemden yararlanma oranında da 1. hafta haricinde gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Yumurta kalite kriterlerinden sarı çapı ve şekil indeksi açısından gruplar arasındaki farklılıklar önemsiz bulunmuştur. Ak indeksi, Haugh birimi, renk skalası ve kabuk kalınlığı açısından ise gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P < 0.05$). Sonuç olarak, yumurtacı tavuk rasyonlarında kullanılan soya fasulyesi küspesinden gelen proteinin %30'una kadarının bezelyeden enzim katılarak veya katılmaksızın karşılanması, performans üzerinde herhangi olumsuz bir etkisinin olmadığı, özellikle %20 ve %30 oranında bezelye proteini içeren rasyonlara enzim katılmasının ak indeksi, haugh birimi ve yumurta sarısı gibi yumurtanın iç kalite kriterleri üzerine önemli derecede olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Yumurta tavuğu, Bezelye, Performans, Yumurta kalite kriterleri



GİRİŞ

Ülkemizde üretimi yapılan, hayvan beslemede kullanılabilecek bitkisel orijinli protein kaynakları sayı olarak yetersiz olup; başlıca soya küspesi, ayçiçeği küspesi, kanola küspesi ve tam yağlı soya olarak sıralanabilir. Bunlar arasında soya küspesi kanatlı rasyonlarında sorunsuz olarak kullanılmaktadır. Diğerlerinin kullanımı değişik nedenlerle sınırlıdır. Yem hammaddeleri içerisinde genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) kullanımında artış ve buna bağlı olarak, Avrupa Birliği ülkelerinin rasyonlarında soya küspesinin kullanımına bir sınırlama getirmiş olması, et-kemik ununun kullanımını yasaklamış olması (Volpelli ve ark. 2009), bilim insanlarını alternatif bitkisel protein kaynağı yemlerin arayışına zorlamaktadır. Proteince zengin bahsi geçen bu ürünlerin kullanımı ile ilgili belirsizlikler ve sınırlamalar olduğundan, protein kaynağı olarak yumurtacı tavukların rasyonlarında bezelye gibi baklagillerin alternatif bir yem kaynağı olarak kullanımını akla getirmektedir. Bezelyenin tek mideli hayvanların rasyonlarında kullanımı sınırlıdır. Bezelyede tek mideli hayvanlarda kullanımı sınırlayan antibesinsel faktörleri; proteaz inhibitörleri (Griffiths 1984), tanenler (Lindgren 1975; Griffiths 1981), lektinler (Bender 1983), ve de nişasta tabiatında olmayan polisakkaritler (Longstaff ve McNab 1987; Saini 1989) olarak sıralayabiliriz. Bezelyedeki bu antibesinsel maddeler bir şekilde elemine edildiği takdirde, bezelyenin çiftlik hayvanları için besin değerini artırdığı bildirilmektedir (Igbasan ve Guenter 1996; Igbasan ve Guenter 1997; Laudadio ve Tufarelli 2010a). Enzim katkıları yumurtacı tavuklarda kapsamlı bir şekilde araştırılmamış olmasına karşın, baklagil esaslı rasyonlarda enzimlerin kullanımı hakkında az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalar genel olarak etçi piliçlerde yapılan çalışmalardır. Özellikle broylerlerde yapılan çalışmalar, bezelye tanesinin hücre duvarında yer alan pektik polisakkaritlerin sebep olduğu (ramnogalaturonanlar, arabinoz, galaktoz ve ksiloz) ıslak altlık probleminin önüne geçmesi ve bezelyenin ileal protein sindirimi ile metabolize olabilir enerjisini artırarak canlı ağırlık artışı ve yem tüketimini artırması açısından karışık enzim ürünlerinin kullanımının (ksilanaz, amilaz, proteaz, pektinaz) olumlu sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir (Khattak ve ark. 2006; Annison ve Choct 1993; Castanon ve Marquart 1989). Yumurtacı tavuklarda ıslak altlık problemi yumurta kalitesi açısından daha da önemli olduğu aşikârdır. Bu nedenle bezelye ile birlikte enzim kullanımının yumurtacı tavuklarda daha etkili olacağı kanısı oluşmuştur.

Bu nedenlerle çalışmanın amacı, yumurtacı tavuk rasyonlarında soya fasulyesi küspesinden gelen proteinin farklı düzeylerde bezelye ile karşılanmanın ve bezelyeli gruplara enzim ilavesinin yumurtacı tavukların performans ve yumurta kalite kriterleri üzerine etkilerini incelemektir

MATERYAL ve METOT

Çalışmanın hayvan materyalini oluşturan tavuklar yarka olarak 18. haftada alınmış ve yumurta verimi pik seviyesine gelinceye kadar beslenmiş (28. Haftada), 2 haftalık alıştırmaya döneminden sonra tavuklar 30 haftalık yaşta iken deneme başlatılmıştır. Deneme 2 hatalık alıştırmaya sonrası 8 hafta sürdürülmüştür. Bu amaçla 343 adet Lohmann beyaz ticari yumurta tavuğu kullanılmıştır. Tavuklar (1) kontrol ve 6 deneme grubundan her birine rastgele dağıtılmıştır. Deneme grupları, bir kontrol ve 6 muamele grubu olmak üzere 7 gruptan, her grup 7 alt gruptan ve her alt grup da 7 yumurta tavuğundan

oluşturulmuştur. Böylece 7 grup x 7 alt grup x 7 yumurta tavuğu olmak üzere her bir grupta 49, toplamda da 343 yumurta tavuğu kullanılmıştır.

Deneme kullanılan yem maddeleri satın alınarak rasyonlar izonitrojenik ve izokalorik olarak hazırlanmıştır (NRC 1994). Kontrol ve deneme rasyonlarının bileşimi Tablo 1'de verilmiştir. Bezelye satın alındıktan sonra besin madde analizleri yapılmış, elde edilen besin madde analiz sonuçlarına göre rasyonlar hazırlanmıştır (AOAC 1984).

Deneme grupları mısır ve soya küspesinden oluşan kontrol grubu, bu grupta soya küspesinden gelen proteinin %10, 20 ve 30' unun bezelyeden karşılandığı 3 grup ve bu gruplara karışık enzim (proteaz, amilaz, xylanaz, beta-glukanaz, fitaz, sellüloz ve pektinaz içerikli) ilavesinin katıldığı 3 ayrı grup olmak üzere toplam 7 grup olarak düzenlenmiştir. Denemede kullanılan Allzyme SSR® adlı enzim Alltech firmasından temin edilmiştir. Allzyme SSR®, üretici firmanın yumurtacı tavuklarda enzim dozunun kullanım tavsiyesi doğrultusunda 150g/ton yem olacak şekilde bezelyeli gruplara ilave edilmiştir.

Tablo 1. Denemede kullanılan rasyonların içeriği ve besin madde bileşimleri, %KM.

Table 1. Content of the rations used in the experiment and nutrient compositions, DM%

Rasyon Hammadde	Kontrol	%10 Bezelye	%20 Bezelye	%30 Bezelye
Bezelye	0	4,44	8,87	13,31
Bitkisel Yağ	2,00	2,00	2,00	2,00
Buğday Kepeği	4,60	2,90	1,00	0,15
Mısır	56,00	54,48	53,25	51,25
Ayçiçeği Küspesi	3,00	3,60	4,00	4,20
Mısır Gluteni	2,00	2,40	2,90	3,40
Soya Küspesi	22,00	19,80	17,60	15,40
Dikalsiyum Fosfat	1,80	1,80	1,80	1,80
DL-Methionin	0,14	0,13	0,13	0,14
Kireç Taşı	7,85	7,85	7,85	7,85
Tuz	0,31	0,30	0,30	0,30
Vitamin-Mineral Karması	0,30	0,30	0,30	0,30
Rasyon Besin Madde				
KM,%	89,67	89,38	88,63	90,24
HP,%	17,99	17,79	17,58	17,78
ME, kcal/kg	2737	2704	2780	2792
HY,%	3,10	3,50	3,77	3,54
HS,%	4,73	4,43	4,13	3,85
HK,%	10,26	11,76	10,04	12,93

Deneme başlangıcında ve sonunda gruplardaki tavuklar tartılarak canlı ağırlık değişimleri tespit edilmiştir. Yem tüketimlerinin belirlenmesi için, yemler önceden tartılarak hayvanlara ad-libitum olarak verilmiş ve her 7 günde bir (haftanın belirlenen aynı gününde) sabah yemleme yapılmadan önce, yemliklerde kalan yemler tartılarak

grupların haftalık yem tüketimleri tespit edildikten sonra, gün ve gruptaki hayvan sayısına bölünerek ortalama günlük yem tüketimleri belirlenmiştir. Üretilen yumurtalar her gün aynı saatte sayılarak kaydedilmiş ve her hafta üretilen yumurta sayıları kullanılarak yumurta verimleri haftalık olarak bulunmuştur. Yemden yararlanma oranı, her gruba ait alt grupların 7 günlük yem tüketimleri ve üretilen yumurta ağırlıkları tespit edilerek, tüketilen yem üretilen yumurta ağırlığına bölünmek suretiyle bir kilogram yumurta için tüketilen toplam yem miktarının tespit edilmesiyle bulunmuştur. Yumurta ağırlıkları, yumurtaların 7 günde bir, oda sıcaklığında bir gün bekletildikten sonra tartılması ile elde edilmiştir. Yumurta kalite özelliklerini belirlemek amacıyla 14 günde bir her tekerrürden 4 adet olmak üzere her bir gruptan toplamda 28 adet yumurta örneği alınmış ve toplanan yumurtalar tartıldıktan sonra kumpas ile en ve boy ölçümleri alınarak şekil indeksleri belirlenmiştir. Yumurtalar cam masaya kırıldıktan 10 dakika sonra yumurta sarı ve ak yüksekliği üçayaklı mikrometre ile sarı çapı, ak uzunluğu ve genişliği ise kumpas ile ölçülmüştür. Bu değerler kullanılarak sarı çapı, ak indeksi ve Haugh birimi değerleri hesaplanmıştır (Card ve Nesheim 1972). Kabuk kalınlığı yumurtaların sivri, küt ve orta kısımlarından alınan örneklerden kabuk zarı çıkarılıp, mikrometre (μm) ile kalınlıkları ölçüldükten sonra bu değerlerin ortalamaları alınarak hesaplanmıştır. Yumurta sarı rengi Roche renk skalası ile tespit edilmiştir.

Araştırmadan elde edilen tüm veriler varyans analizine tabi tutulmuştur. (SAS 1995) Gruplar arasındaki farklılıklar ise Duncan testi ile belirlenmiştir. ($P<0.05$) (Steel ve Torrie 1980).

BULGULAR

Araştırmada oluşturulan deneme gruplarının haftalara göre günlük yem tüketimi Tablo 2'de, yemden yararlanma oranı Tablo 3' de, haftalara göre gruplardaki yumurta verimleri Tablo 4'de, haftalara göre gruplardaki yumurta ağırlıkları Tablo 5'de, sarı çapı, ak indeksi, Haugh birimi, renk skalası, kabuk kalınlığı, şekil indeksi ve ortalama yumurta ağırlıkları ise Tablo 6'da gösterilmiştir. Sekiz haftalık araştırma sonunda genel olarak tüm haftalar ve son hafta itibarıyla günlük yem tüketiminde, yemden yararlanma oranları ve yumurta sayılarında istatistiksel olarak önemli bir değişiklik görülmemiştir ($P>0.05$). Yumurta kalite kriterlerinden ak indeksi, Haugh birimi ve renk skalası için D1E grubu dışındaki enzimli gruplarda kontrole göre önemli bir yükseklik tespit edilirken ($P<0.05$), sarı çap ve şekil indeksi açısından gruplar arasında istatistikî açıdan önemli bir farklılık görülmemiştir ($P>0.05$). Fakat kabuk kalınlığında D3 grubunda kontrole göre önemli oranda bir azalma ($P<0.05$) bulunurken, yumurta ağırlığında da yine D3 ve D2 gruplarında kontrole göre önemli bir azalma tespit edilmiştir ($P<0.05$).

Tablo 2. Denemede yer alan yumurta tavuklarının haftalara göre günlük yem tüketim değerleri, g/gün

Table 2. Daily feed consumption values of the laying hens in the experiment according to weeks, g / day

GRUPLAR	HAFTALAR							
	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
K	117,22±2,21	118,97±1,17	117,56±1,88	121,82±3,66	116,39±4,39 ^{ab}	121,80±1,98	122,72±1,68	118,23±2,80
D1	118,27±2,39	117,81±3,25	123,10±3,99	113,13±5,68	121,22±4,88 ^{ab}	115,79±5,59	115,77±5,91	113,17±5,97
D2	119,03±3,17	119,34±2,06	121,39±3,64	115,90±4,44	122,04±1,79 ^{ab}	117,35±2,32	121,24±1,55	118,29±1,91
D3	116,33±4,23	112,15±6,35	123,90±3,96	109,92±7,64	111,85±6,38 ^b	113,17±9,31	120,97±2,27	107,56±8,15
D1E	120,54±1,09	122,60±1,09	119,64±1,57	120,22±3,50	119,41±2,42 ^{ab}	119,31±3,26	121,93±3,33	121,26±3,35
D2E	120,92±2,06	118,55±4,84	121,39±6,76	118,34±2,40	124,97±1,32 ^a	115,34±2,52	115,71±2,63	115,80±4,33
D3E	121,24±0,58	116,42±2,81	115,26±2,61	115,11±2,53	124,21±3,29 ^{ab}	119,56±2,34	121,76±3,11	107,97±5,83

Tablo 3. Denemede yer alan yumurta tavuklarının haftalara göre yemden yararlanma oranları.

Table 3. Feed conversion rates of laying hens in the experiment according to weeks

GRUPLAR	HAFTALAR							
	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
K	0,91±0,03 ^{ab}	0,93±0,03	0,94±0,02	0,95±0,02	0,94±0,03	0,94±0,03	0,92±0,03	0,94±0,03
D1	0,97±0,01 ^a	0,98±0,01	0,97±0,02	0,98±0,01	0,95±0,02	0,97±0,02	0,97±0,02	0,99±0,01
D2	0,93±0,02 ^{ab}	0,95±0,02	0,97±0,02	0,98±0,01	0,97±0,01	0,99±0,01	0,97±0,01	0,98±0,01
D3	0,87±0,05 ^b	0,94±0,02	0,94±0,03	0,95±0,03	0,95±0,03	0,94±0,03	0,97±0,04	0,95±0,03
D1E	0,94±0,02 ^{ab}	0,95±0,01	0,94±0,01	0,96±0,01	0,96±0,01	0,96±0,02	0,95±0,02	0,97±0,02
D2E	0,96±0,01 ^a	0,93±0,04	0,98±0,01	0,97±0,03	0,96±0,02	0,95±0,02	0,93±0,02	0,91±0,04
D3E	0,95±0,01 ^{ab}	0,97±0,01	0,99±0,01	0,97±0,01	0,98±0,01	0,97±0,01	0,98±0,01	0,97±0,02

Tablo 4. Denemede yer alan yumurta tavuklarının haftalara göre gruplardaki yumurta verilerimleri, %**Table 4.** The egg production of the laying hens in the experiment according to the weeks in the groups, %

GRUPLAR	HAFTALAR							
	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
K	91,00±2,57 ^{ab}	92,71±2,57	93,57±2,43 ^{ab}	94,71±2,00	93,57±3,14	93,86±2,71	92,14±3,43	94,43±2,71
D1	96,57±1,00 ^a	98,00±0,57	95,86±2,71 ^{ab}	94,14±3,14	91,29±4,86	91,57±4,29	90,71±3,29	92,43±4,29
D2	92,71±2,29 ^{ab}	94,71±2,29	96,86±1,57 ^{ab}	98,00±0,71	97,14±0,86	98,57±0,57	97,14±0,57	97,71±1,00
D3	85,43±5,86 ^b	90,71±4,57	87,71±6,43 ^b	89,14±6,57	88,86±6,43	88,86±6,71	90,43±6,29	86,00±6,57
D1E	93,57±1,57 ^{ab}	94,71±1,29	93,86±1,14 ^{ab}	95,86±1,43	96,14±1,00	94,43±2,29	93,00±2,14	95,00±2,29
D2E	95,57±0,86 ^a	93,86±4,00	99,00±1,00 ^a	98,00±2,00	95,86±3,00	94,86±2,57	90,86±3,00	89,86±4,14
D3E	94,71±1,29 ^a	98,00±1,29	93,57±2,43 ^a	99,00±1,00	99,00±1,00	94,86±2,00	95,86±2,14	91,86±4,29

Tablo 5. Denemede yer alan yumurta tavuklarının haftalara göre yumurta ağırlıkları, g.**Table 5.** Egg weights of the laying hens in the experiment according to the weeks, g

GRUPLAR	HAFTALAR							
	1. hafta	2. hafta	3. hafta	4. hafta	5. hafta	6. hafta	7. hafta	8. hafta
K	60,46±0,49	61,10±0,28	62,37±0,37	61,90±0,57	62,37±0,69	63,68±0,42 ^a	63,15±0,63	62,66±0,97 ^a
D1	59,98±0,82	60,23±0,79	62,10±0,90	61,76±0,67	61,35±0,64	62,35±0,79 ^{ab}	62,38±0,82	62,86±0,53 ^a
D2	59,17±0,78	59,88±0,52	61,04±0,47	60,49±0,62	61,24±0,53	60,67±0,58 ^{bc}	62,87±0,83	61,66±0,74 ^{ab}
D3	58,48±1,60	58,48±1,60	60,91±0,61	61,40±0,62	61,41±0,65	60,17±0,63 ^c	61,53±0,52	60,71±0,56 ^b
D1E	59,52±0,72	60,24±0,99	61,25±0,55	61,06±0,53	61,54±0,50	62,17±0,39 ^{ab}	62,60±0,56	62,55±0,38 ^{ab}
D2E	59,45±0,56	60,58±0,65	61,00±0,79	61,31±0,46	61,84±0,41	62,30±0,37 ^{ab}	63,73±1,00	63,50±0,33 ^a
D3E	60,32±0,30	61,32±0,50	61,86±0,21	61,82±0,83	61,85±0,54	62,25±0,72 ^{ab}	63,27±0,61	62,43±0,46 ^{ab}

Tablo 6. Denemede yer alan yumurta tavuklarına ait yumurta kalite kriterleri değerleri**Table 6.** Egg quality criteria values for laying hens in the experiment

Gruplar	Sarı Çap , mm	Ak İndeksi, %	Haugh Birimi	Renk Skalası	Kabuk Kalınlığı mm	Şekil İndeksi	Yumurta Ağırlığı, g
K	39,46±0,16	9,17±0,09 ^c	85,30±0,35 ^b	10,65±0,09 ^c	0,36±0,006 ^a	76,12±0,27	62,94±0,27 ^a
D-1	39,69±0,22	9,48±0,09 ^{ab}	86,15±0,44 ^{ab}	10,75±0,13 ^{ab}	0,36±0,002 ^{ab}	76,14±0,28	62,23±0,37 ^{ab}
D-2	39,58±0,17	9,35±0,08 ^{bc}	85,51±0,28 ^b	10,68±0,10 ^c	0,35±0,002 ^{ab}	76,03±0,25	61,57±0,32 ^{bc}
D-3	39,37±0,14	9,46±0,09 ^{ab}	86,14±0,39 ^{ab}	10,60±0,11 ^c	0,35±0,002 ^c	75,87±0,25	61,15±0,35 ^c
D-1E	39,70±0,12	9,21±0,09 ^c	85,25±0,38 ^b	10,69±0,09 ^c	0,35±0,002 ^{ab}	75,61±0,21	62,67±0,38 ^a
D2-E	39,79±0,12	9,61±0,07 ^a	86,62±0,28 ^a	11,03±0,10 ^a	0,35±0,002 ^{ab}	76,07±0,19	62,39±0,28 ^{abc}
D-3E	39,83±0,15	9,63±0,08 ^a	86,88±0,36 ^a	11,04±0,05 ^a	0,35±0,002 ^{ab}	76,09±0,20	62,39±0,38 ^{ab}

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanatlı rasyonlarında kullanılan en önemli bitkisel orijinli protein kaynağı soya fasulyesi küspesinde GDO kullanımına bağlı artan endişeler ve büyük oranda ithal edilen soya fasulyesi küspesine bağlı ihtiyacı azaltmaya yönelik bir çalışma olan bu denemede, soya fasulyesi küspesi temelli kontrol grubu ile bezelyeli ve enzim katkılı bezelyeli grupların günlük yem tüketimleri Tablo 2' de sunulmuştur. Tablo incelendiğinde haftalara göre günlük yem tüketimlerinde 5. hafta haricinde gruplar arasında önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Denemenin 5.

haftasında D3 grubunda bulunan tavukların D2E grubunda yer alanlara oranla daha az yem tükettikleri görülmüştür ($P<0.05$), ancak diğer gruplar istatistiksel olarak benzer miktarda yem tüketmiştir. Son hafta verilerine göre kontrol grubundakiler ortalama 118.23 g/gün yem tüketirken, D1, D2, D3, D1E, D2E ve D3E grubundakiler sırasıyla, 113.17, 118.29; 107.56, 121.26, 115.80 ve 107.97 g/gün yem tüketmişlerdir. Genel olarak incelendiğinde rakamsal olarak kontrole göre D1E grubu hariç diğer gruplarda daha az yem tüketimi olmuştur. Özellikle D3 ve D3E gibi bezelyenin en yüksek oranda kullanıldığı gruplarda rakamsal olarak düşüş dikkat çekicidir. Ancak

istatistiki olarak gruplar arasında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Bu sonuçlara paralel olarak Tablo 3'de sunulan haftalara göre yemden yararlanma oranlarında da gruplar arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılık göstermemiştir. Bu sonuçlara benzer olarak, Ciurescu ve Pana (2017), yumurtacı tavuklarda soya fasulyesi küspesine alternatif olarak herhangi bir muameleye tabi tutulmamış bezelyeye ayrıca enzim de ilave ederek yaptıkları çalışmalarında bezelye ve bezelye + enzimli gruplarda kontrole göre yemden yararlanma oranlarında istatistiksel olarak herhangi bir farklılık oluşmadığını bildirmişlerdir. Yine farklı baklagillerden, bakla , (vicia faba), adi fiğ (Vicia sativa), bezelye (Pisum sativum) ve mavi lupin (Lupinus angustifolius)'nin protein kaynağı olarak hazırlanan rasyonlarla yapılan çalışmalardan (Farran ve ark. 2001; Hammershøj ve Steenfeldt 2005; Laudadio ve Tufarelli 2010b) elde edilen yemden yararlanma oranına ait bulgular ile mevcut çalışmanın bulguları uyumludur. Bununla birlikte, Perez-Maldonado ve ark. (1999); Fru-Nji ve ark. (2007) bakla, bezelye, nohut veya tatlı lüpen'in kanatlı rasyonlarında kullanımının yem tüketiminin önemli ölçüde etkilendiğini bildirmektedir. Bu farklılık, kullanılan baklagillerin rasyondaki oranlarındaki farklılıkla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Denemede elde edilen, haftalara göre yumurta verimleri Tablo 4' te verilmiştir. Buna göre ilk hafta haricinde yumurta üretiminde deneme gruplarında kontrole göre anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. Nitekim birçok araştırmacı mevcut araştırmanın sonucu ile benzer olarak alternatif baklagil tanelerinin yumurta üretimi üzerine herhangi bir etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Castanon ve Perez-Lanzac 1990; Fru-Nji ve ark. 2007). Soya küspeli rasyonlarla karşılaştırılan ve beklenen bu etki ancak, bezelye bazlı rasyona metiyonin ve triptofan takviyesi ile başarılabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanında, Ciurescu ve Pana (2017), bezelyeli ve bezelye+ Allzyme Vegpro katılan rasyonlarda yumurta üretiminin soya küspeli kontrol rasyonuna göre önemli derecede arttığını rapor etmişlerdir. Bu mevcut literatür bulguları söz konusu çalışmada elde edilen verileri destekler niteliktedir.

Çalışmada elde edilen haftalara göre yumurta ağırlıkları Tablo 5' de sunulmuştur. Tablo 5'e göre, son hafta itibariyle D3 grubundaki yumurta ağırlıklarının kontrole göre önemli derecede düşük ($P<0.05$) olması dışında gruplar arasında önemli bir farklılık saptanmamıştır. Yine Tablo 6' da sunulan yumurta ağırlıklarının genel ortalamaları incelendiğinde D2 ve D3 gruplarının kontrol grubuna kıyasla önemli derecede düşük ($P<0.05$), diğer gruplar ise benzer bulunmuştur. Rasyonlarda soya küspesi yerine kullanılan bezelye miktarı arttıkça (D2 ve D3) yumurta ağırlığında önemli oranda bir düşüş görülmesi bezelye içerisinde bulunan antibesinsel faktörlerden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Nitekim bu rasyonlara (D2E ve D3E) enzim ilave edilmesiyle bu etkinin ortadan kalkması bu görüşü doğrular niteliktedir. Benzer şekilde, yumurtacı tavuk rasyonlarına bezelye+enzim katılan deneme gruplarının, soya küspesi kullanılan kontrol rasyonu ile karşılaştırıldığında yumurta ağırlığında gruplar arasında önemli bir fark tespit edilmediği çalışmalar araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Castanon ve Perez-Lanzac 1990; Fru-Nji ve ark. 2007; Ciurescu ve Pana 2017).

Yumurta kalite kriterlerine ait veriler Tablo 6'da sunulmuştur. Gruplar arasında sarı çap (39.37-39.83 mm) ile şekil indexi (%75.61-76.14) açısından istatistiki olarak önemli farklılıklar oluşmamıştır. Yumurtada tazeliğin belirtisi olan ak indexi ve Haugh biriminde kontrole göre önemli derecede farklılıklar görülmüştür ($P<0.05$). Ak

indeksinde D1E (4.68) ve D2 (4,82) grupları hariç, sırasıyla D1 (4.95), D3 (4.93), D2E (5.08) ve D3E (5.10) deneme gruplarında kontrole göre önemli derecede artış tespit edilmiştir ($P<0,05$). Yine buna paralel olarak Haugh birimi de, D2E (86.62) ve D3E (86.88) gruplarında kontrol grubuna (85.30) göre önemli ölçüde yüksek bulunmuştur. Söz konusu çalışmadan farklı olarak bezelye ile yapılan çalışmalarda, soya küspesi yerine bezelye kullanımının ak indeksi ve haugh birimi üzerine herhangi bir farklılığa sebep olmadığı rapor edilmiştir (Fru-Nji ve ark. 2007; Ciurescu ve Pana 2017). Hatta aksine baklagil kullanılan yumurtacı tavuk rasyonlarında yumurta kalitesinin önemli orada düştüğüne dair bildirişler de bulunmaktadır (Hammershøj ve Steenfeldt 2005).

Tablo 6'da yumurta sarılarına ait renk skalası verilmiştir. Bu değerler incelendiği zaman D1 (10.75), D2E(11.03) ve D3E (11.04) gruplarında kontrol grubuna(10.65) göre önemli derecede bir artış görülmektedir ($P<0.05$). Bu çalışmada elde edilen yumurta sarılarına ait renk skalası sonuçları, Ciurescu ve Pana (2017)'nin bildirdiği bezelyenin yumurta sarısı üzerine olumlu etkisi ile benzerlik göstermektedir. Yine benzer şekilde, Igbasan ve Guenter (1997) ile Laudadio ve Tufarelli (2012) yapmış oldukları çalışmalarında, rasyonlarda bezelye kullanımının yumurta sarısı üzerine olumlu etkileri olduğunu ve bu etkinin de özellikle bezelyenin içerdiği ksantofillerden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda özellikle bezelye+enzimli gruplarda (D2E ve D3E) önemli derecede yüksek çıkan yumurta sarısı rengi, bezelyedeki antibesinsel faktörlerin elemantasyonunda enzimin önemli etkisi olduğunu düşündürmektedir. Buna karşılık Ciurescu ve Pana (2017), bezelyeli gruplarda yumurta sarısının soya küspeli kontrol grubuna kıyasla önemli derecede yüksek bulmalarına rağmen, bezelyeli enzimli gruplarda kontrole göre benzer çıkmasını, bezelyenin içerdiği antibesinsel faktörlerin az olmasına bağlamışlardır. Bunun da özellikle ekim zamanına göre ekimi yapılan varyetelerin içerdiği antibesinsel faktörlerinin varlığıyla alakalı olabileceği bildirilmiştir. Şöyle ki; Smulikowska ve ark. (2001) bahar dönemi ekilen bezelye çeşitlerinde tripsin ve proteaz inhibitörlerinin rolünün daha az olduğu bildirmişlerdir. Buda kullanılan bezelyenin ekim zamanının bezelyenin antibesinsel madde içeriği üzerine etkili olduğunu göstermiştir. Yukarıda bahsedilen çalışmalar arasında oluşan farklılıkların nedenlerinden biride kullanılan bezelyenin ekim zamanında ki farklılıktan kaynaklanıyor olabileceği düşünülmüştür. Yumurtanın dış kalite kriterlerinden olan kabuk kalınlıklarının gruplara göre ortalama değerleri Tablo 6'da verilmiştir. Buna göre, D3 grubundaki kabuk kalınlığının (0.35) kontrole (0.36) göre önemli derecede düşük bulunması dışında diğer gruplar arasında farklılık gözlenmemiştir. Yumurta kabuk kalınlığı normal değerleri 0.30-0.35 arasında olduğundan (Şenköylü 2001) D3 deki değer de zaten kırılmaya dayanıklı ve normal kalite sınırları içerisinde olan bir değer olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak, yumurtacı tavuk rasyonlarında sıklıkla kullanılan soya fasulyesi küspesinden gelen proteinin %30'a kadarının bezelyeye enzim katılarak veya katılmaksızın karşılanmasının performans üzerinde herhangi olumsuz bir etki olmadığı, özellikle %20 ve %30 oranında bezelye+enzim katkılı gruplarda yumurta iç kalite kriterlerinden ak indeksi, haugh birimi ve yumurta sarısı üzerinde kontrole göre olumlu etkisi olduğu görülmüştür. Buda yumurta tavuklarında soya fasulyesi kaynaklı proteinin %30 kadarının bezelyeden sağlanabileceği kanısını oluşturmuştur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2011-VF-002 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- AOAC (1984)**. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis, 14th ed. Arlington, Virginia, USA.
- Annison G, Choct M (1993)**. Enzymes in poultry diets. Enzymes in Animal Nutrition. Proceedings of the 1st Symposium. 61-68, Kartause Ittingen, Switzerland.
- Bender AE (1983)**. Haemagglutinins (lectins) in beans. Food Chem, 11, 309-320.
- Card LE, Nesheim MC (1972)**. Poultry Production. 11th ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- Castanon JIR, Marquart RR (1989)**. Effect of enzyme addition, autoclave treatment and fermenting on the nutritive of field beans (*Vicia faba L.*) Anim Feed Sci Tech, 26, 71-89.
- Castanon JIR, Perez -Lanzac J (1990)**. Substitution of fixed amounts of soybean meal for field beans (*Vicia faba*), sweet lupins (*Lupinus albus*), cull peas (*Pisum sativum*) and vetches (*Vicia sativa*) in diets for high performance laying Leghorn hens. Br Poult Sci, 31, 173-180.
- Ciurescu G, Pană CO (2017)**. Effect of dietary untreated field pea (*Pisum sativum L.*) as substitute for soybean meal and enzymes supplementation on egg production and quality of laying hens. Rom Biotechnol Lett, 22(1), 12204- 12213.
- Farran MT, Dakessian PB, Darwish AH ve ark. (2001)**. Performance of broilers and production and egg quality parameters of laying hens fed 60% raw or treated common vetch (*Vicia sativa*) seeds. Poult Sci, 80, 203-208.
- Fru-Nji F, Niess E, Pfffer E (2007)**. Effect of Graded Replacement of Soybean Meal by Faba Bean or Field Peas in Rations for Laying Hens on Egg Production and Quality. J Poult Sci, 44 (1), 34-41.
- Griffiths DW (1984)**. The trypsin and chymotrypsin inhibitor activities of various peas (*Pisum spp.*) and field bean (*Vicia faba*) cultivars. J Sci Food Agric, 35, 481-486.
- Griffiths DW (1981)**. The polyphenolic content and enzyme inhibitory activity of test as from bean (*Vicia faba*) and peas (*Pisum spp.*) varieties. J Sci Food Agric, 32, 797-804.
- Hammershøj M, Steinfeldt S (2005)**. Effects of blue lupin (*Lupinus angustifolius*) in organic layer diets and supplementation with foraging material on egg production and some egg quality parameters. Poult Sci, 84, 723-733.
- Igbasan FA Guenter W (1996)**. The enhancement of the nutritive value of peas for broiler chickens: An evaluation of micronization and dehulling processes. Poult Sci, 75, 1243-1252.
- Igbasan FA, Guenter W (1997)**. The influence of micronization, dehulling, and enzyme supplementation on the nutritional value of peas for laying hens. Poult Sci, 76, 331-337.
- Khattak FM, Pahsa TN, Hayat Z, Mahmud A (2006)**. Enzymes In Poultry Nutrition. J Anim Pl Sci, 16(1-2).
- Laudadio V, Turafelli V (2010a)**. Growth performance and carcass and meat quality of broiler chickens fed diets containing micronized-dehulled peas (*Pisum sativum cv Spirale*) as a substitute of soybean meal. Poult Sci, 89, 1537-1543.
- Laudadio V, Turafelli V (2010b)**. Treated fava bean (*Vicia faba var. minor*) as substitute for soybean meal in diet of early phase laying hens: Egg-laying performance and egg quality. Poult Sci, 89, 2299-2303.
- Laudadio V, Turafelli V (2012)**. Effect of treated field pea (*Pisum sativum L. cv Spirale*) as substitute for soybean extracted meal in a wheat middlings-based diet on egg production and quality of early layingbrown hens. Arch Geflügelk, 76 (1), 1-5.
- Lindgren E (1975)**. The nutritive value of peas and field beans for hens. Swed J Agric Res, 5, 159-161.
- Longstaff M, Mcnab JM (1987)**. Digestion of starch and fibre carbohydrates in peas by adult cockerels. Br Poult Sci, 28, 261-285.
- NRC (1994)**. Nutrient Requirements Of Poultry. 9th Rev. Ed. National Academy Press, Washington, DC.
- Perez -Maldonado RA, Mannion PF, Farrell DJ (1999)**. FARRELL. Optimum inclusion of field peas, faba beans, chick peas, sweet lupins in poultry diets. I. Chemical composition and layer experiments. Br Poult Sci, 40, 667-673.
- Saini HS (1989)**. Legume seed oligosaccharides. Pages 329-340 In: *Recent Advances of Research in Antinutritional Factors in Legumes Seeds*. J. Huisman, T.F.B. van der Poel, and I. E. Liener, ed. Pudoc, Wageningen, The Netherlands.
- SAS (1995)**. Statistic Software Programme User Guide. SAS, Inst. Inc. Cary. NC.
- Smulikowska S, Pastuszewska B, Swiech E ve ark. (2001)**. Tannin content affects negatively nutritive value of pea for monogastric. J Anim Feed Sci, 10, 511-523.
- Steel RG, Torrie JH (1980)**. Principle and Procedures of Statistics (2nd Ed.), Mc Donald BookCo., Inc., New York.
- Şenköylü N (2001)**. Yemlik Yağlar. NRA, Tekirdağ.
- Volpelli LA, Comellini M, Masoero F ve ark. (2009)**. Pea (*Pisum sativum*) in Dairy Cow Diet: Effect on Milk Production and Quality. Ital J Anim Sci, 8(2), 245-257.



Comparative Investigation of *Fasciola hepatica* Prevalence by Coproantigen-Elisa and Stool Examination Methods in Sheep in Van Province

Suzan EROL ESİM^{1*} Nalan ÖZDAL² Bekir OĞUZ²

¹ Van Yuzuncu Yil University, Dursun Odabas Medical Center, Van, Türkiye

² Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Van, Turkey

Received: 20.12.2019

Accepted: 29.04.2020

ABSTRACT

This study was carried out to determine the prevalence of fasciolosis in sheep in Van province by coproantigen-ELISA and sedimentation-zinc sulphate flotation technique. Fecal samples collected from 141 sheep were examined by sedimentation-zinc sulphate flotation technique. Modified McMaster sedimentation technique was applied to the egg positive samples to determine the egg per gram feces (EPG) values. *Fasciola hepatica* coproantigens in fecal samples were investigated by the coproantigen-ELISA technique. The coproantigen-ELISA, coprological, and total prevalence of fasciolosis were determined as 19.85%, 11.34% and 20.5%, respectively. The EPG value in infected sheep was $91,6 \pm 64,1$. The prevalence of fasciolosis infection was observed higher in 4-5 age group (30%) than 2-3 age group (13.5%), the differences between age groups were found significant ($p < 0.05$). The prevalence of fasciolosis in female and male sheep was found as 20.6% and 20%, respectively ($p > 0.05$). In the fecal examination, sheep were also found to be infected with *Dicrocoelium dentriticum* (17.7%), *Trichuris ovis* (12%), *Oestertagia* spp. (12%), *Trichostrongylus* spp. (9.9%), *Nematodirus* spp. (5.7%) and *Paramphistomum* spp. (2.8%). This study was the first investigation of ovine fasciolosis by coproantigen ELISA technique in Van province. It has been thought that the prevalence of fasciolosis may vary according to the diagnostic methods applied and should be interpreted with caution since the results reflect different stages of the infection.

Keywords: Coproantigen-ELISA, Fasciolosis, Prevalence, Sheep, Van

ÖZ

Van İlinde Koyunlarda *Fasciola hepatica* Prevalansının Koproantijen-Elisa ve Dışkı Muayene Yöntemleri ile Karşılaştırmalı Araştırılması

Bu çalışma, Van ilinde koyunlarda fasciolosisin yayılışını koproantijen-ELISA ve sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon yöntemleri ile tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Toplam 141 koyundan alınan dışkı örnekleri sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon metoduyla *Fasciola hepatica* yumurtaları yönünden muayene edilmiştir. Pozitif örneklerde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) modifiye McMaster sedimentasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Dışkı örneklerinde *F. hepatica* antijenlerinin varlığı koproantijen-ELISA testi ile araştırılmıştır. Fasciolosisin koproantijen-ELISA, dışkı muayenesine ve totale göre prevalansı sırası ile %19,85, %11,34 ve %20,5 belirlenmiştir. Enfekte hayvanlarda EPG değeri $91,6 \pm 64,1$ bulunmuştur. Fasciolosisin prevalansı 4-5 yaş grubunda (%30) 2-3 yaş grubuna (%13,5) göre daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p < 0,05$). Cinsiyete göre prevalansın dişilerde ve erkeklerde sırasıyla %20,6 ve %20 olduğu belirlenmiştir ($p > 0,05$). Dışkı muayenesinde, koyunların *Dicrocoelium dentriticum* (%17,7), *Trichuris ovis* (%12), *Oestertagia* spp. (%12), *Trichostrongylus* spp. (%9,9), *Nematodirus* spp. (%5,7) ve *Paramphistomum* spp. (%2,8) ile de enfekte olduğu görülmüştür. Bu çalışma Van ilinde yetiştirilen koyunlarda fasciolosisin koproantijen-ELISA tekniği ile araştırıldığı ilk çalışmadır. Fasciolosis prevalansının uygulanan teşhis metodlarına göre değişebileceği ve sonuçların enfeksiyonun farklı aşamalarını yansıttığı için dikkatli yorumlanması gerektiği düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Koproantijen-ELISA, Fasciolosis, Prevalans, Koyun, Van



GİRİŞ

Fasciolosis; başta koyun, keçi, sığır, manda ve deve olmak üzere çeşitli evcil ve yabani hayvanlarda ve insanlarda hastalıklara sebep olan ve karaciğerde *Fasciola hepatica* ve *F. gigantica* başta olmak üzere Fasciolidae ailesindeki trematodlar tarafından oluşturulan bir hastalıktır (Soulsby 1986). Fascioliasisli koyun ve sığırlarda ağırlık kaybı, süt ve döl veriminde azalma, yapağı kalitesinde düşüş görüldüğü, ayrıca fascioliasisin ketozise neden olduğu, Ostertagia ve Babesia enfeksiyonlarına karşı da vücut direncinin zayıflatıldığı belirtilmiştir (Cawdery 1984). Ara konaklığını Lymnaeidae ailesindeki çeşitli sümüklülerin yaptığı *F. hepatica*, karaciğer kelebekleri arasında en yaygın tür olup oluşturduğu patojenite ile özellikle koyunlarda endemik alanlarda yüksek mortalite ve morbiditeye, büyümede geriliğe, karaciğer kayıplarına, sekonder enfeksiyonlara duyarlılığa ve kontrol önlemleri giderlerinin artmasına yol açarak önemli ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (Malone ve ark. 1998).

Fasciolosisin teşhisinde genelde dışkıda parazitin yumurtaları aranır. Parazitin yumurtalarını dışkıyla çevreye bırakması için karaciğerde göçlerini tamamlamaları ve safra kanalında olgunlaşması gerekmektedir. Bu yüzden *Fasciola* türlerinin dışkı muayenesi ile koyunlarda en erken teşhisi ancak enfeksiyonun alımından sonraki 10. haftada mümkün olmaktadır. Bunun yanında alınan parazitler, konak immunitesine bağlı olarak her zaman karaciğerde olgun döneme ulaşamamaktadırlar. Oysaki parazitler esas patojenik etkisini göç döneminde yani prepatent dönemden önce göstermektedir. Bu sebeple parazitin erken dönem teşhisine yönelik alternatif immünolojik yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden özellikle ELISA, parazitin erken dönemlerde belirlenmesi, daha pratik olması ve sürü taramalarında kolaylıkla uygulanabilir olması sebebiyle günümüzde daha çok tercih edilmektedir. Özellikle paraziter antijenleri dışkıda saptayan ELISA oldukça yüksek spesifite göstermekte ve enfeksiyonun mevcut durumunu ortaya koyabilmektedir (Reichel 2002; Salimi-Bejestani ve ark. 2005).

Bu çalışmada, koproantijen-ELISA ve sedimentasyon yöntemleri ile Van ilinde yetiştirilen koyunlarda fasciolosis prevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Sahası ve Örneklerin Toplanması

Bu çalışmanın materyalini, Van ve yöresinde yetiştirilen ve rastgele seçilen, tamamı meraya çıkmış, toplam 141 koyundan alınan dışkıları oluşturmuştur. Bu amaçla her hayvanın rektumundan yaklaşık 20-30 gr dışkı, dışkı poşetlerine alınmış, numaralandırılarak protokole geçirilmiş ve laboratuvara getirilmiştir. Hayvanların yaş ve cinsiyetleri kaydedilmiştir. Dışkı numuneleri inceleninceye kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Dışkı Örneklerinin İncelenmesi

Parazitolojik muayene

Koyunlardan alınan dışkı örneklerinde *Fasciola* spp. yumurtalarının aranması amacıyla sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon metodu kullanılmıştır (Charlier ve ark. 2008). *Fasciola* spp. yumurtaları yönünden pozitif saptanan dışkı örneklerinde gram dışkıdaki yumurta sayısı (EPG) modifiye McMaster sedimentasyon yöntemi ile belirlenmiş ve aşağıdaki formüle göre hesaplama yapılmıştır (Conceição ve ark. 2002).

$$EPG = \frac{\text{Toplam yumurta sayısı}}{\text{Kamera Sayısı}} \times \frac{50\text{ml}/10\text{gr}}{0,15\text{ml}}$$

Koproantijen-ELISA metodu

Önce sedimentasyon-çinko sülfat flotasyon yöntemi ile incelenmiş olan örnekler daha sonra ticari ELISA kitiyle (BIO-X *Fasciola hepatica* Antigenic ELISA Kiti, BIO K 201/2, Jemelle-Belçika) üretici firmanın önerdiği biçimde *F. hepatica* koproantijenleri yönünden incelenmiştir. Hazırlanan mikroplyetler ELISA okuyucusunda (Bio-Tek Instruments, MicroQuant mikroplyet reade) 450 nm dalga boyunda okutulmuştur.

ELISA test sonuçlarının değerlendirilmesi

Her bir örnek için net OD değeri, pozitif kuyucuktaki (*F. hepatica* antikorları ile kaplı) OD değerinden onun eşi olan negatif kuyucuktaki (kontrol kuyucuğu) OD değerinin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Test pozitif kontrol antijeni ile elde edilen OD'nin üretici açıklamalarında (QC data sheet) verilen değerden (0,800) büyük olması halinde geçerli kabul edilmiştir. Daha sonra her bir örnek için elde edilen NET OD değerleri aynı plakada yürütülen NET pozitif kontrol antijen OD değerine bölünmüş ve 100 ile çarpılarak yüzde pozitif hesaplanmıştır ve % 8 'in üzerindeki örnekler pozitif (+), diğerleri negatif (-) olarak belirlenmiştir.

$$\text{Değer} = \frac{\text{NET OD (örnek)}}{\text{NET OD (pozitif kontrol)}} \times 100$$

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi için SPSS 22.0 istatistik paket programında Pearson's Ki-kare (χ^2) testi uygulandı ve p< 0.05 değerleri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Van ilinde koyunlarda fasciolosis varlığını belirlemek için yapılan çalışma sonucunda toplam %20.5 (29/141) prevalans tespit edilmiştir (Tablo 1). Fasciolosisin koproantijen ELISA ve dışkı muayenesine göre prevalansı sırası ile %19.85 ve %11.34 olarak belirlenmiştir. Koproantijen pozitif koyunların %53.57 (15/28)'sinin dışkı muayenesinde *Fasciola* spp. yumurtası (Şekil 1) tespit edilmiştir.

Tablo 1. Koyunlarda *F. hepatica*'nın dışkı muayenesi ve Koproantijen-ELISA yöntemlerine göre dağılımı

Table 1. Distribution of *F. hepatica* in sheep according to the methods of coproantigen-ELISA and stool examination

Muayene Edilen Koyun Sayısı	Dışkı Muayenesi + Kopro ELISA +		Dışkı Muayenesi - Kopro ELISA +		Dışkı Muayenesi + Kopro ELISA -		Toplam	
	n	%	n	%	n	%	n	%
141	15	10.6	13	9.2	1	0.7	29	20.5

Tablo 2. Koyunlarda *F. hepatica*'nın yaş ve cinsiyete göre dağılımı**Table 2.** Distribution of *F. hepatica* in sheep related age and gender

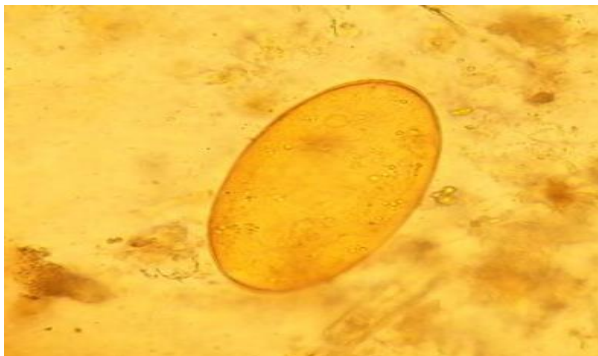
	Muayene Edilen Koyun Sayısı	Enfekte Koyun		χ^2	P
		n	%		
Cinsiyet					
Dişi	116	24	20.6	0.006	0.938
Erkek	25	5	20		
Yaş Grupları					
2-3	81	11	13.5	5.688	0.017*
4-5	60	18	30		
Toplam	141	29	20.5		

χ^2 : Pearson's Ki-kare Testi, *: p<0.05

Tablo 3. Koyunlarda diğer helmint türlerinin yayılışı**Table 3.** Distribution of other helminth species in sheep

Helmint Türü	Yaş		Cinsiyet				Toplam (n=141)			
	2-3 (n=81)		4-5 (n=60)		Dişi (n=116)		Erkek (n=25)			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
<i>Trichuris ovis</i>	7	8.6	10	16.7	15	12.9	2	8	17	12
<i>Dicrocoelium dentriticum</i>	11	13.6	14	23.3	19	16.4	6	24	25	17.7
<i>Paramphistomum spp.</i>	2	2.5	2	3.3	4	3.4	-	-	4	2.8
<i>Oestertagia spp.</i>	7	8.6	10	16.7	12	10.3	5	20	17	12
<i>Tricostrongylus spp.</i>	8	9.9	6	10	11	9.5	3	12	14	9.9
<i>Nematodirus spp.</i>	4	4.9	4	6.7	6	5.2	2	8	8	5.7

Bir koyunda dışkı muayenesinde yumurtaya rastlanmasına rağmen dışkıda *Fasciola* antijenleri belirlenmemiştir. Enfekte koyunlarda gram dışkıdaki ortalama yumurta sayısı (EPG) 91.6 ± 64.1 (27.5-155.7) bulunmuştur. *Fasciola hepatica* enfeksiyonunun prevalansı koyunların yaşına göre değerlendirildiğinde 4-5 yaş grubundaki prevalans, 2-3 yaş grubuna göre daha yüksek belirlenmiş ve bu farklılık istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Koyunlarda fasciolosisin yayılışı cinsiyete göre değerlendirildiğinde enfeksiyon dişilerde %20.6, erkeklerde %20 tespit edilmiştir. Cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0.05) (Tablo 2). Dışkı muayenesi yapılan koyunlarda *F. hepatica* haricinde diğer helmint türleri de tespit edilmiş, bu türlerin koyunların yaş ve cinsiyetine göre dağılımı belirlenmiştir (Tablo 3).

**Şekil 1.** Enfekte koyun dışkısında *Fasciola* spp. yumurtası**Figure 1.** *Fasciola* spp. egg in infected sheep feces

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çeşitli ülkelerde ve Türkiye'de fasciolosisin epidemiyolojisi ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve çok farklı sonuçlar elde edilmiştir. Dünyanın farklı ülkelerinde fasciolosisin koyunlardaki yayılışı %4'den %61.6'ya varan oranlarda değişmektedir (Hammami ve ark. 2007; Kantzoura ve ark. 2011; Domke ve ark. 2013; Rinaldi ve ark. 2015). Ülkemizde ise fasciolosisin prevalansı mezbahe muayenesine göre %0.6'dan %95'e (Vural 1970; Gargılı ve ark. 1999), dışkı muayenesi sonuçlarına göre %0.8'den %20.99 (Celep ve ark. 1990; Ütük ve ark. 2012), serumda antikorların tespitine dayanan çalışmaların sonuçlarına göre ise %0'dan %49.43'e (Denizhan 2010; Ütük ve ark. 2012) kadar değişen oranlarda bildirilmiştir.

Karapınar (2009) Sivas Zara'da koyunlarda fasciolosis enfeksiyonunun yaygınlığını koproantijen-ELISA ile %5.97 oranında bildirmiştir. Van'da koyunlarda fasciolosisin yaygınlığı daha önce dışkı muayenesi (Denizhan 2010), nekropsi (Toparlak ve Gül 1988) ve serumda antikor tespitine dayanan serolojik (Denizhan 2010) çalışmalarla bildirilmiş olup, Van'da enfeksiyonun prevalansı koproantijen-ELISA ile ilk defa bu çalışma ile ortaya konmuştur. Bu çalışma ile koyunlarda *F. hepatica*'nın yaygınlığı Sedimentasyon-Çinko sülfat flotasyon tekniği ile yapılan dışkı muayenesinde %11.34, koproantijen-ELISA ile %19.85, ve totalde ise %20.5 belirlenmiştir. Bu sonuçlar Samsun (%20.99; Celep ve ark. 1990), Bursa (%28.5; Akyol 2001), Elazığ (%20-22.2; Ütük ve ark. 2012), Sinop (%25.4; Açıcı ve ark. 2017) ve daha önce Van'da (%15.9-15.63; Toparlak ve Gül 1988; Denizhan 2010) yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile paralellik

göstermektedir. Ayrıca bu çalışmadan elde ettiğimiz bulgular, daha önce hayvanlarda yapılan çalışmalara ek olarak insanlarda fasciolosis enfeksiyonunun dışkı muayenesine göre %1.8, ELISA sonuçlarına göre ise %5.6 (Taş Cengiz ve ark. 2011) olduğu Van ilinin fasciolosisin yayılışı için uygun olduğu kanaatini desteklemiştir.

Ruminantlarda *F. hepatica* enfeksiyonunu saptamak için bugüne kadar geleneksel sedimentasyon ve flotasyon teknikleri ile dışkıda yumurta tespiti, serum ve sütte antikorların saptanması, dışkıdaki koproantijen veya DNA'nın ve kandaki birçok biyokimyasal belirteçlerin tespitine dayanan teşhis yöntemleri kullanılmıştır (Fairweather 2011).

Laboratuvar materyalinin ucuzluğu ve aktif enfeksiyonların tespiti açısından, koprolojik teknikler avantajlıdır, ancak zaman alıcıdır, uzman personel gerektirir, duyarlılıkları düşüktür ve patent enfeksiyonlu hayvanların sadece %60-70'ini tespit etmektedir (Anderson ve ark. 1999; Rapsch ve ark. 2006; Charlier ve ark. 2008; Mezo ve ark. 2011). Dışkı muayenesiyle enfeksiyonun erken teşhisi enfeksiyondan sadece 10-11 hafta sonrasında mümkün olmakla birlikte hafif enfeksiyonlar tespit edilemez ve enfekte olmuş hayvanlar, enfekte olmamış hayvanlar için bir enfeksiyon kaynağı olarak hizmet ederler. Ayrıca, konakçı yaşı, dışkı suyu miktarı ve dışkı miktarı (Charlier ve ark. 2008) gibi diğer faktörler, dışkıda yumurta sayısının hassasiyetini etkileyebilir (Alvarez Rojas ve ark. 2014). Dahası yumurtaların başarılı tedaviden sonra en az 2 hafta boyunca safra kesesinde tutulması nedeniyle yanlış pozitiflik meydana gelebilir (Flanagan ve ark. 2011).

Antikor tespit testleri ise mükemmel hassasiyetle enfeksiyonun erken tespitini sağlar ancak, çoğu hayvandaki antikor seviyeleri tedaviden yaklaşık 2-4 ay sonrasında da antikor-ELISA'nın pozitif eşliğinin üzerinde kalır (Gaasenbeek ve ark. 2001; Sanchez-Andrade ve ark. 2001; Salimi-Bejestani ve ark. 2005). Bu nedenle antikor-ELISA'ya dayalı prevalans verisinin mevcut enfeksiyon durumu hakkında güvenilir olmayabileceği ve testin yalnız mevcut enfeksiyonu değil, sadece bir süre parazite maruz kalmayı ölçtüğü düşünülmektedir (Arifin ve ark. 2016).

Dolaşımdaki veya dışkıdaki *Fasciola* spp. antijenlerinin tespit edilmesine yönelik yöntemler, koprolojik ve serolojik tekniklerle ilgili yukarıda sözü edilen sorunları çözmektedir (Martinez-Sernandez ve ark. 2016). Diğer helmintlerden gelen antijenlerle çapraz reaksiyonu bulunmayan ve aynı zamanda yumurta üretiminden 1-5 hafta önce *Fasciola* enfeksiyonlarının saptanmasına olanak sağlayan kopro-ELISA tekniğinin yüksek duyarlılık (%94) ve özgüllüğü (%100) olduğu bildirilmiştir (Mezo ve ark. 2004). Dışkı muayenesi negatif kaldığı zaman, enfeksiyonun prepatent evresinde fasciolosisi teşhis etmek için kopro-ELISA tekniği altın standart olarak kabul edilmektedir (Mezo ve ark. 2004; Valero ve ark. 2009). Antikorlardan ziyade antijenlerin saptanması, hem enfeksiyon durumunu değerlendirmek (Endah Estuningsih ve ark. 2004) hem de fasciolosis'e karşı kemoterapinin etkinliğini değerlendirmek için iyi bir prosedür olarak kabul edilir (Flanagan ve ark. 2011; Gordon ve ark. 2012; Brockwell ve ark. 2014).

Şimdiye kadar Türkiye'de fasciolosisin prevalansı üzerine yapılan çalışmaların çoğu mezbaaha bakışı ve dışkı muayenelerine dayanmaktadır. Ancak son yıllarda ruminantlarda sınırlı sayıda araştırmacı bu konuda immunoserolojik olarak prevalans çalışmaları yapmıştır (Yavuz ve ark. 2007; Yıldırım ve ark. 2007; Karapınar 2009; Ütük ve ark. 2012; Avcioglu ve ark. 2014; Açıcı ve

ark. 2017; Bostancı ve Oguz 2017; Çelik ve Aslan Çelik 2018; Çelik ve ark. 2019). Karapınar (2009) Sivas'ın Zara yöresinde koyunlarda fasciolosisin koproantijen-ELISA ve dışkı muayenesine göre prevalansını sırası ile %5.97 ve %3.48 belirlemiştir. Arifin ve ark. (2016) inceledikleri 64 hayvanın 53'ünün *F. hepatica*'nın antikorları, 36'sının koproantijenleri, 28'inin ise yumurtaları yönünden pozitif olduklarını bildirmişlerdir. Erzurum'da sığırlarda fasciolosisin prevalansı kopro-ELISA ile %35.46, antikor-ELISA ile %61.70, sedimentasyon yöntemi ile %34.04 bildirilmiştir (Avcioglu ve ark. 2014).

Bu çalışmada, koproantijen tespiti, %100 spesifitesi olan kopro-ELISA testi kullanılarak gerçekleştirildi (Martinez-Perez ve ark. 2012). Fasciolosisin kopro antijen-ELISA ve dışkı muayenesine göre prevalansı sırası ile %19.85 ve %11.34 olarak belirlenmiştir. Kopro antijen ELISA ile pozitif koyunların %46.4'ünde (13/28) dışkı muayenesinde *Fasciola* spp. yumurtaları tespit edilmemiştir. Bu sonuç, diğer çalışmalarla (Karapınar 2009; Martinez-Perez ve ark. 2012; Avcioglu ve ark. 2014; Arifin ve ark. 2016) uyumlu olarak kopro-ELISA testinin dışkı bakışına göre daha duyarlı olduğunu göstermektedir. Nitekim koproantijen ELISA testi ile metaserkerlerin alınmasından 4 hafta sonra pozitif sonuç alınabilmektedir (Martinez-Perez ve ark. 2012). Hafif enfeksiyonlarda yumurtaların ancak tekrarlanan dışkı muayenelerinde görüldüğü, *Fasciola* spp. yumurtalarının günden güne ve gün içinde atılımında değişiklikler gösterdiği, dışkıdaki yumurta dağılımının düzensiz olduğu ve yalnızca dışkı muayenesi ile gram dışkıdaki yumurta sayısının fasciolosisin gerçek durumunu yansıtmadığı (Honer 1965a; Honer 1965b; Kassai ve ark. 1988; Hansen ve Perry, 1994) dikkate alındığında koproantijen-ELISA testinin hastalığın ve enfeksiyon düzeyinin belirlenmesinde oldukça kullanışlı ve spesifik olduğu görülmektedir.

Martinez-Perez ve ark. (2012) *F. hepatica* ile deneysel enfekte koyunlarda enfeksiyondan 4 hafta sonra hayvanların %57.1'inde, 7 hafta sonra %85.3'ünde, 8. haftadan itibaren ise hayvanların tümünde *Fasciola* koproantijenlerine rastladıklarını bildirirken, deneysel enfekte koyunlarda dışkıda yumurtalara sedimentasyon yöntemiyle en erken enfeksiyondan 9 hafta sonra rastlanmasına rağmen, bunun tüm koyunlarda ancak 12 haftaya kadar mümkün olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar doğal enfekte 45 koyunun hepsinde ELISA ile koproantijenlere rastlarken sedimentasyon ile ancak 24'ünde dışkıda yumurtaya rastlamışlardır.

Charlier ve ark. (2008) sensitivite ve spesifiteyi sırasıyla sedimentasyon (10 g) ile dışkı muayenesi için %64 (%53-74) ve %93 (%87-97), antikor-ELISA için %87 (%78-93) ve %90 (%83-95) ve kopro-ELISA için %94 (%87-98) ve %93 (%86-97) bildirmişlerdir. Farklı tekniklerle elde edilen yaygınlık oranlarının yorumlanmasında dikkatli olmalıdır. Fasciolosis'e elde edilen prevalans oranlarındaki farklar etkenin biyolojik seyriyle bağlantılı olarak yöntemlerin prensipleri ile ilişkili olabilir (Avcioglu ve ark. 2014). Örneğin antikor-ELISA test sonucu, tedavi edilmesine rağmen geçmiş fasciolosis'ten gelişen antikorları, diğer trematodlar arasındaki çapraz reaksiyonları, mevcut fasciolosisi veya tüm bu faktörleri birlikte yansıtabilir. Öte yandan açılan büyük safra kanallarının muayenesi ile tüm enfekte olmuş karaciğerlerin sadece %71'inin tespit edildiği, geri kalan %29'unun sadece karaciğerin dilimlenmesi ve suda bekletilmesinden sonra tespit edildiği bildirilmiştir. Bu nedenle mezbahada karaciğer muayenesinin altın standart olarak düşünülebilmesi için sadece ana safra kanallarının

muayenesinin yeterli olmayacağı karaciğerin önce bütün halde sıcak suda 1 saat bekletilmesinin sonra 1-2 cm lik küçük parçalara bölüldükten sonra sıcak su dolu bir kapta bekletilip süzülmesinin gerektiği bildirilmiştir (Charlier ve ark. 2008). Bu çalışmada sedimentasyon metoduyla, kopro-ELISA tekniği arasındaki prevalans farkı %8.51 dir. Sedimentasyon dışı yöntemi konakta olgun parazit tarafından üretilen dışkıdaki yumurtaların tespitine ve sayımına dayanır, bununla birlikte, kopro-ELISA yöntemi, safra yolu içinde bulunan olgunlaşmamış/olgun parazitlerin ES antijenlerinin saptanmasına dayanır. Böylece, %8.51'lik fark, prepatent enfeksiyonları belirten ve dışkıda belirlenebilen yumurtaları üretmek için yeterince olgunlaşmamış parazitlerin varlığını yansıtabilir.

Fasciolosis prevalansını tespit etmeye yönelik yapılan bazı çalışmalarda (Akyol 2001; Altaş ve ark. 2003; Moriena ve ark. 2004; Yavuz ve ark. 2007; Karapınar 2009, Denizhan 2010; Şen ve ark. 2011) prevalansın yaş ilerlemesiyle arttığı bildirilmiştir. Bu çalışmada da koyunlarda yaş gruplarına göre en yüksek prevalans araştırmacıların bildirdiklerine benzer olarak 4-5 yaş grubunda (%30) belirlenmiş bunu %13.5 ile 2-3 yaş grubu izlemiştir. Bu durumun nedeni yaşlı hayvanların merada daha uzun süre *F. hepatica* metaserkerleriyle karşı karşıya kalmalarından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, Maqbool ve ark. (2002), yaşlı hayvanlarda prevalanstaki artışın, çevresel faktörlere karşı direnç azalmasından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir.

Bazı çalışmalarda (Maqbool ve ark. 2002; Opara 2005; Denizhan 2010; Şen ve ark. 2011; Bostancı ve Oguz 2017) fasciolosisin yayılışında cinsiyetin etkisinin olmadığı bildirilirken, bazılarında (Phiri ve ark. 2005; Yavuz ve ark. 2007; Yıldırım ve ark. 2007) ise dişilerde erkeklerden daha fazla rastlandığı bunun nedeninin ise dişilerin besiden ziyade süt amaçlı yetiştirilmelerinden kaynaklı daha uzun süre yaşamaları ve meraya daha fazla çıkmaları olarak izah edilmiştir (Phiri ve ark. 2005). Bu çalışmada da araştırmacıların çalışmalarına benzer olarak cinsiyetin fasciolosisin yayılışına etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, Van ilinde daha önce farklı yöntemlerle varlığı bildirilen fasciolosisin, koproantijen-ELISA ile koyunlardaki prevalansı ilk kez bu çalışma ile ortaya konulmuştur. Fasciolosisin koproantijen-ELISA, dışkı muayenesine ve totale göre prevalansı sırası ile %19.85, %11.34 ve %20.5 belirlenmiştir. Elde edilen enfeksiyon oranı fasciolosisin Van ilinde koyunlarda hala yaygınlığını ve önemini koruduğunu göstermektedir. Yöntemler arasında prevalans farkları dikkate alındığında; koproantijen-ELISA testinin uygulanması çeşitli dezavantajları bulunan dışkı muayenesiyle karşılaştırıldığında dışkıda yumurtaların görülmediği prepatent enfeksiyonlarda önem taşımaktadır. Özellikle dışkı muayenelerinin negatif olduğu durumlarda aktif enfeksiyonların tespiti için sedimentasyonla dışkı muayenesinin yanında eş zamanlı koproantijen-ELISA tekniğinin yapılması tavsiye edilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

TEŞEKKÜR

Yazarlar, bu çalışmaya maddi desteklerinden dolayı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi BAP koordinasyon birimine (Proje No: 2015-SBE-YL023) teşekkür ederler.

KAYNAKLAR

- Açıcı M, Büyüktanır Ö, Bölükbaşı CS, Pekmezci GZ, Gürler AT, Umur S (2017).** Serologic detection of antibodies against *Fasciola hepatica* in sheep in the middle Black Sea region of Turkey. *J Microbiol Immunol and Infect*, 50, 377-381.
- Akyol ÇV (2001).** Bursa ortak girişim tesislerinde (Etba) kesilen koyunlarda distomatosis'in yayılışı. *J Fac Vet Med*, 20, 23-27.
- Altas MG, Sevgili M, Gökçen A, İriadam M (2003).** Sanlıurfa'da kesilen koyunlarda karaciğer trematodlarının yaygınlığı. *Türk Parazitol Derg*, 27 (3), 195-198.
- Alvarez Rojas CA, Jex AR, Gasser RB, Scheerlinck JP (2014).** Techniques for the diagnosis of *Fasciola* infections in animals: Room for improvement. *Adv Parasitol*, 85, 65-107.
- Anderson N, Luong TT, Vo NG, Buia KL, Smoother PM, Spithill TW (1999).** The sensitivity and specificity of two methods for detecting *Fasciola* infections in cattle. *Vet Parasitol*, 83, 5-24.
- Arifin MI, Höglund J, Novobilsk A (2016).** Comparison of molecular and conventional methods for the diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Vet Parasitol*, 232, 8-11.
- Avcioglu H, Güven E, Balkaya I, Kaynar O, Hayirli A (2014).** Evaluation of coprological and serological techniques for Diagnosis of bovine fasciolosis. *Israel J of Vet Med*, 69 (4), 203-210.
- Bostancı A, Oguz B (2017).** Copro-ELISA prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle in Van, Turkey. *Acta Sci Vet*, 45, pub:1465.
- Brockwell YM, Elliott TP, Anderson GR, Stanton R, Spithill TW, Sangster NC (2014).** Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int J Parasitology Drug Resist*, 4, 48-54.
- Cawdery MSH (1984).** Review of the economic importance of fascioliasis in sheep and cattle. *Irish Veterinary News*, september, 14-22.
- Çelik OY, Aslan Celik B (2018).** Investigation of the Prevalence of *Fasciola hepatica* in Small Ruminants in the Siirt Region, Turkey. *Iran J Parasitol*, 13(4), 627-631.
- Çelik OY, Aslan Celik B, İrak K, Akgül G (2019).** Assessment of prevalence of *Fasciola hepatica* and associated biochemical alterations in the cattle of Siirt province, Turkey. *Indian J Anim Res*, 53 (2), 260-263.
- Charlier J, De Meulemeester L, Claerebout E, Williams D, Vercruyse J (2008).** Qualitative and quantitative evaluation of coprological and serological techniques for the diagnosis of fasciolosis in cattle. *Vet Parasitol*, 153, 44-51.
- Celep A, Açıcı M, Çetindag M, Coskun SZ, Gürsoy S (1990).** Samsun yöresi sığırlarında helmintolojik araştırmalar. *Etilik Vet Mik Derg*, 6, 117-130.
- Conceição MA, Durao RM, Costa IH, da Costa JM (2002).** Evaluation of a simple sedimentation method (modified McMaster) for diagnosis of bovine fasciolosis. *Vet Parasitol*, 105 (4), 337-343.
- Endah Estuningsih S, Widjayanti S, Adiwinata G, Piedrafita D (2004).** Detection of coproantigens by sandwich ELISA in sheep experimentally infected with *Fasciola gigantica*. *Trop Biomed*, 21, 51-56.
- Denizhan V (2010).** Van ili ve bazı ilçelerinde koyunlarda *Fasciola hepatica*'nın seroprevalansı. Doktora tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Van.
- Domke AV1, Chartier C, Gjerde B, Leine N, Vatn S, Stuen S (2013).** Prevalence of gastrointestinal helminths, lungworms and liver fluke in sheep and goats in Norway. *Vet Parasitol*, 194, 40-48.
- Fairweather I (2011).** Reducing the future threat from (liver) fluke: realistic prospect or quixotic fantasy. *Vet Parasitol*, 180, 133-143.
- Flanagan A, Edgar HW J, Gordon A, Hanna REB, Brennan GP, Fairweather I (2011).** Comparison of two assays, a faecal egg count reduction test (FECRT) and a coproantigen reduction test (CRT), for the diagnosis of resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol*, 176, 170-176.
- Gaasenbeek CPH, Moll L, Cornelissen JBW, Vellema P, Borgsteede FHM (2001).** An experimental study on triclabendazole resistance of *Fasciola hepatica* in sheep. *Vet Parasitol*, 95, 37-43.
- Gargılı A, Tüzer E, Gülanber A ve ark. (1999).** Trakya'da kesilen koyun ve sığırlarda karaciğer trematod enfeksiyonlarının yaygınlığı. *Türk J Vet Anim Sci*, 23 (2), 115-116.
- Gordon DK, Zadoks RN, Stevenson H, Sargison ND, Skuce PJ (2012).** On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Vet Parasitol*, 187, 436-444.
- Hammami H, Hamed N, Ayadi A (2007).** Epidemiological studies on *Fasciola hepatica* in Gafsa Oases (south west of Tunisia). *Parasite*. 14 (3) 261-264.
- Hansen J, Perry B (1994).** The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of Ruminants. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya, pp. 35-42.

- Honer MR (1965a)**. The interpretation of faecal egg-counts. I. Daily variations in *Fasciola hepatica* egg-counts in cattle. *Z Parasitenkde*, 26, 143-155.
- Honer MR (1965b)**. The interpretation of faecal egg-counts. II. Single and multiple sampling in the diagnosis of sub-clinical fascioliasis hepatica. *Z Parasitenkde*, 26, 156-162.
- Kantzoura V, Kouam MK, Demiris N, Feidas H, Theodoropoulos G (2011)**. Risk factors and geospatial modelling for the presence of *Fasciola hepatica* infection in sheep and goat farms in the Greek temperate Mediterranean environment. *Parasitology*, 138 (7), 926-938.
- Karapınar A (2009)**. Zara Yöresinde koyunlarda *Fasciola hepatica* prevalansının Copro-Elisa ve dışkı muayene yöntemleriyle araştırılması. Yüksek lisans tezi, Erciyes Üni. Sağ. Bil. Enst, Kayseri.
- Kassai T, Cordero del Campillo M, Euzeby J, Gaafar S, Hiepe T, Himonas CA (1988)**. Standardized Nomenclature of Animal Parasitic Diseases (SNOAPAD). *Vet Parasitol*, 29, 299-326.
- Malone JB, Gommers R, Hansen J et al. (1998)**. A geographic information system on the potential distribution and abundance of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* in East Africa based on food and agriculture organization databases. *Vet Parasitol*, 78 (2), 87-101.
- Martínez-Pérez JM, Robles-Pérez D, Rojo-Vázquez FA, Martínez-Valladares M (2012)**. Comparison of three different techniques to diagnose *Fasciola hepatica* infection in experimentally and naturally infected sheep. *Vet Parasitol*, 190, 80-86.
- Martínez-Sernandez V, Orbegozo-Medina RA, Gonzalez Warleta M, Mezo M, Ubeira FM (2016)**. Rapid enhanced MM3-COPRO ELISA for detection of *Fasciola* coproantigens. *PLoS Negl Trop Dis*, 10,7, e0004872.
- Maqbool A, Hayat CS, Akhtar T, Hashmi HA (2002)**. Epidemiology of fasciolosis in buffaloes under different managemental conditions. *Vet arhiv*, 72, 221-228.
- Mezo M, Gonzalez-Warleta M, Carro C, Ubeira FM (2004)**. An ultrasensitive capture ELISA for detection of *Fasciola hepatica* coproantigens in sheep and cattle using a new monoclonal anti- body (MM3). *J Parasitol*, 90, 845-852.
- Mezo M, González-Warleta M, Castro-Hermida JA, Muiño L, Ubeira FM (2011)**. Association between anti-*F. hepatica* antibody levels in milk and production losses in dairy cows. *Vet Parasitol*, 180, 237-242.
- Moriña R, Racioppi O, Alvarez JD (2004)**. Fasciolosis en bovinos del nordeste argentino. Prevalencia según edad. *Rev Vet*, 15, 3-4.
- Opara KN (2005)**. Population dynamics of *Fasciola gigantica* in cattle slaughtered in Uyo, Nigeria. *Trop Anim Health Prod*, 37, 363-368.
- Phiri AM, Phiri IK, Sikasunge CS, Monrad J (2005)**. Prevalence of fasciolosis in Zambian cattle observed at selected abattoirs with Emphasis on age sex and origin. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 52, 414-416.
- Rapsch C, Schweizer G, Grimm F et al. (2006)**. Estimating the true prevalence of *Fasciola hepatica* in cattle slaughtered in Switzerland in the absence of an absolute diagnostic test. *Int J Parasitol*, 36, 1153-1158.
- Reichel MP (2002)**. Performance characteristics of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of liver fluke (*Fasciola hepatica*) infection in sheep and cattle. *Vet Parasitol*, 107 (1-2), 65-72.
- Rinaldi L, Biggeri A, Musella V et al. (2015)**. Sheep and *Fasciola hepatica* in Europe: the GLOWORM experience. *Geospatial Health*, 9 (2), 309-317.
- Salimi-Bejestani MR, McGarry JW, Felstead S, Ortiz P, Akca A, Williams DJ (2005)**. Development of an antibody-detection ELISA for *Fasciola hepatica* and its evaluation against a commercially available test. *Res Vet Sci*, 78 (2), 177-181.
- Sanchez-Andrade R, Paz-Silva A, Suarez JL, et al. (2001)**. Effect of fasciolicides on the antigenaemia in sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Parasitol Res*, 87, 609-614.
- Soulsby EJJ (1986)**. Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals. London. Bailliere Tindall.
- Şen M, Yıldırım A, Bişkin Z, Düzlü Ö, İnci A (2011)**. Derinkuyu Yöresindeki Sığırlarda Fasciolosisin Kopro-ELISA ve Dışkı Muayene Yöntemleriyle Araştırılması. *Türk Parazitoloj Derg*, 35, 81-85.
- Taş Cengiz Z, Yılmaz H, Dülger AC, Akdeniz H, Çiçek M, Karahocagil M (2011)**. Van yöresinde insanlarda *Fasciola hepatica*'nın seroprevalansı. 17. Ulusal Parazitoloji Kongresi, Kars, Türkiye, 4-10 Eylül, ss.239-239.
- Toparlak M, Gül Y (1988)**. Van ili Belediye Mezbahasında kesilen koyunlarda karaciger trematod enfeksiyonları üzerinde araştırmalar. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 35 (2-3), 269-274.
- Ütük AE, Şimşek S, Köroğlu E (2012)**. A comparison of faecal examination, commercial ELISA kit, and indirect-ELISA methods in the diagnosis of sheep fasciolosis. *Small Rumin Res*, 107, 164- 166.
- Valero MA, Ubeira FM, Khoubbane M et al. (2009)**. MM3-ELISA evaluation of coproantigen release and serum antibody production in sheep experimentally infected with *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. *Vet Parasitol*, 159, 77-81.
- Vural A (1970)**. Trakya Bölgesi koyunlarındaki helmint invazyonları durumun tespiti ve bunlara karşı etkili kombine bir tedavi sisteminin geliştirilmesi. *Pendik Vet Kont Arst Enst Derg*, 3, 2, 33-55.
- Yavuz A, İnci A, Yıldırım A, İca A, Düzlü Ö (2007)**. Sığırlarda *Fasciola hepatica*'nın Yayılışı. *Sağ Bil Derg*, 16, 96-102.
- Yıldırım A, İca A, Düzlü Ö, İnci A (2007)**. Prevalence and risk factors associated with *Fasciola hepatica* in cattle from Kayseri province, Turkey. *Revue Med Vet*, 158, 613-617.



Hepatoprotective Effect of Silymarin Against Diethylnitrosamine Induced Oxidative and Nitrosative Stress in Rats

Emin KARAKURT¹ Serpil DAĞ¹

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

Received: 27.01.2020

Accepted: 30.04.2020

ABSTRACT

Liver cancer is the third most common cancer-related death in the World. Hepatocellular carcinoma (HCC) constitutes %70-85 of liver malignant primary tumors. In this study; we aimed to investigate the role of diethylnitrosamine (DEN) in the experimental liver cancer model and to examine the hepatoprotective effect of silymarin in detail using oxidative-nitrosative stress markers with immunohistochemical methods. For this purpose, 50 Wistar Albino male rats were divided into 5 groups with 10 rats. Animals in DEN group received DEN at a dose of 50 mg/kg once a week for 20 weeks. The rats in the DEN +Silymarin group were Silymarin intraperitoneally for 21 weeks 3 times a week at a dose of 100 mg/kg, starting 1 week prior to the administration of DEN. Silymarin was administered to rats in the group of Silymarin 3 times a week intraperitoneally for 20 weeks at a dose of 100 mg/kg. The rats in the control group were fed pellet feed and drinking water for 20 weeks. Animals in Sham group were treated with propylene glycol dissolved in 0,9 % NaCl intraperitoneally 3 times a week for 20 weeks. At the end of 21 weeks, macroscopically different size and number of nodular structures were detected in the DEN and DEN+Silymarin group. The microscopic examination revealed that the nodules were HCC. As a result, DEN induced liver cancer; however, silymarin did not show a statistically significant protective effect in terms of iNOS and Nitrotyrosine expressions.

Keywords: Diethylnitrosamine, Hepatocellular Carcinoma, Nitrosative Stress, Oxidative Stress, Silymarin

ÖZ

Ratlarda Dietilnitrozamin Uygulanarak Oluşturulan Oksidatif ve Nitrozatif Strese Karşı Silimarin'in Karaciğer Koruyucu Etkisinin Araştırılması

Karaciğer kanseri dünyada kanserle ilişkili ölümlerde üçüncü sırada yer almaktadır. Hepatoselüler karsinom (HSK) primer karaciğer kanserlerinin %70-85'ini oluşturmaktadır. Bu çalışmada; deneysel karaciğer kanseri modelinde Dietilnitrozamin (DEN)'in rolünü araştırmayı ve silimarinin hepatoprotektif etkisini oksidatif-nitrozatif stres markerleri kullanarak immunohistokimyasal yöntemlerle ayrıntılı olarak incelemeyi amaçladık. Bu amaçla 50 adet Wistar Albino cinsi erkek rat 10'arlı 5 gruba ayrıldı. DEN grubundaki hayvanlara 50 mg/kg dozunda haftada 1 kez deneme süresince DEN uygulaması yapıldı. DEN+silimarin grubundaki ratlara DEN uygulamasından 1 hafta önce başlayacak şekilde 100 mg/kg dozunda haftada 3 kez deneme süresince intraperitoneal yolla silimarin (propilen glikolde çözündürülmüş) uygulandı. Kontrol grubundaki ratlara deneme süresince pelet yem ve içme suyu verildi. Sham grubundaki hayvanlara % 0.9 NaCl içerisinde çözündürülmüş propilen glikol intraperitoneal yolla haftada 3 kez deneme süresince verildi. Silimarin grubundaki ratlara 100 mg/kg dozunda deneme süresince intraperitoneal yolla haftada 3 kez silimarin uygulandı. 21 haftanın sonunda DEN ve DEN+silimarin gruplarında makroskopik olarak farklı büyüklük ve boyutlarda nodüler yapılar tespit edildi. Mikroskopik incelemede nodüllerin HSK oldukları belirlendi. Sonuç olarak DEN'in karaciğer kanserini indüklediği; silimarinin ise iNOS ve Nitrotyrosin ekspresyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir koruyucu etki göstermediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Dietilnitrozamin, Hepatoselüler Karsinom, Nitrozatif Stres, Oksidatif Stres, Silimarin

INTRODUCTION

Liver cancer, in the cancer-related deaths, is the second in males and sixth in females (Kim et al., 2015). Hepatocellular Carcinoma (HCC) constitutes 70-85% of the primary malignant tumors of liver (Shirakami et al. 2012).

Factors such as chronic hepatitis B and C, long-term alcohol consumption, aflatoxin intake, steatohepatitis, nitrosamines, environmental carcinogens, malnutrition and obesity have been shown to contribute to the etiology of HCC (Bishayee et al. 2010). Oxidative stress; the



presence of excessive reactive oxygen species (ROS) occurs when the critical balance deteriorates due to the depletion of antioxidants or both (Ghosh et al. 2012). Biomolecules and macromolecules in the cells are the main target of oxidative stress; it causes membrane and nuclear fragmentation, chromosomal abnormalities, and lipid peroxidation that triggers carcinogenesis (Gupta et al. 2013). Oxidative stress plays an important role in the development of HCC (Bishayee et al. 2013).

Diethylnitrosamine (DEN), an N-Nitroso alkyl component, is one of the most important environmental carcinogens and is used in animal experimental models as a strong hepatotoxin and hepatocarcinogen (Kumar and Vijayalakshmi 2015). DEN has been suggested to cause ROS resulting in oxidative stress and cellular damage. ROS production is responsible for the carcinogenic effects of DEN (Shaarawy et al. 2009). ROS, which occurs during metabolism of DEN, reacts with different biomolecules (nucleic acid, protein, lipid etc.) (Aparicio-Bautista et al. 2013). The presence of ROS leads to protein carbonylation, peroxidation of lipids and DNA damage leading to cytotoxicity, carcinogenicity and mutagenicity (Ali et al. 2014). Silymarin has been used in the treatment of liver and bile diseases for more than 2000 years (Madrigal-Santillán et al. 2014). Silymarin removes free radicals such as hydroxyl, superoxide and hydrogen peroxide, reduces lipid peroxidation, increases superoxide dismutase (SOD) activity and regulates the content of cellular glutathione by maintaining homeostasis (Razavi-Azarkhiavi et al. 2014).

In this study; we aimed to investigate the role of DEN in the experimental liver cancer model, and to evaluate the hepatoprotective effect of silymarin by using oxidative-nitrosative stress markers (iNOS and Nitrotyrosine) by immunohistochemical staining technique.

MATERIALS and METHODS

Fifty male Wistar-Albino rats aging 2 months were provided by Erzurum Veterinary Control Institute Experimental Animals Unit. Under suitable conditions (23 ± 2 °C, % 55 humidity rate, 12 hour day-night cycle), they were hosted in the Kafkas University Experimental Animal Application and Research Center. The ethics committee report of the study was taken from Kafkas University Animal Experimentals Local Ethics Committee (KAU-HADYEK-2015-095). During the trial, the animals were given standart feed and water ad libitum. The rats were randomly divided into 5 equal groups. DEN group: At a dose of 50 mg/kg, DEN (Sigma N 0756) was administered intraperitoneally for 20 weeks, once a week. DEN+silymarin group: At a dose of 50 mg/kg, DEN was administered intraperitoneally for 20 weeks, once a week. Silymarin (Sigma-Aldrich, N 0292) (dissolved in propylene glycol) at a dose of 100 mg/kg was administered intraperitoneally for 21 weeks, three times a week, starting 1 week before DEN administration. Control group: The trials were given pellet feed and drinking water for 20 weeks. Sham group: Propylene glycol (75/25) dissolved in 0,9 % NaCl was administered intraperitoneally three times a week. Silymarin group: At a dose of 100 mg/kg, silymarin was administered intraperitoneally three times a week for 20 weeks.

At the end of the study systemic necropsy was performed. Liver samples from rats were fixed in 10 % buffered formaldehyde solution (Merck). After routine procedures, paraffin blocks were prepared and sections with a thickness of 5 μ m were taken and stained with Hematoxylin Eosin (H&E). The Sections were examined

with a light microscope (Olympus Bx53) to determine the histopathological changes and photographed with Cell ^P Program (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4).

Avidin-Biotin Peroxidase method was used as immunohistochemical method. For immunohistochemical staining, the sections of 4 μ m in thickness taken to poly-L-lysine coated slides were deparaffinized and rehydrated in graded alcohols. In order to prevent endogenous peroxidase activity, the sections were treated with 3% hydrogen peroxide solution in Phosphate Buffered Saline (PBS) for 15 minutes. For antigen retrieval, the sections were boiled in Citrat Buffer Solution (pH 6) for 25 min in the microwave oven (at 800 watt). In order to prevent nonspecific staining, the sections were incubated for 30 min with non-immune serum (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) at room temperature.. Diluted antibodies (iNOS (Santa Cruz, sc-7271, Dilution Ratio 1:100) and Nitrotyrosine (Santa Cruz, sc-32731, Dilution Ratio 1:250) were incubated for one hour at room temperature.. The sections were washed 3 times in PBS solution for 5 minutes, and the biotinylated secondary antibody (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) were applied to them at room temperature for 30 minutes. After washing in PBS (3-5 min), all sections were incubated with peroxidase-bound Streptavidin (Genemed Biotechnologies REF 54-0003) for 30 minutes at room temperature. A solution of 3,3-diaminobenzidine tetra hydrochloride (DAB) (Genemed Biotechnologies REF 10-0048) was used as a chromogen for 15 minutes. The sections were treated with Mayer's Hematoxylin for 30 second and washed in running water for 5 min, dehydrated in graded alcohols, cleared in xylene and coated with entellan. Primary antibodies were omitted from the negative control sections and were treated with diluted diluted normal serum. The slides prepared after the covering were examined under a light microscope (Olympos Bx53) and photographed via the Cell^P program (Olympos Soft Imaging Solutions GmbH, 3,4). Analyzes of the images were done with Image J Program (1.51j8).

Analysis of immunohistochemical staining results; Nitrotyrosine (NT) and Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) immunoreactivities were scored by number of positive cells in the areas that best reflect the character of staining. For quantification of the immunostaining in the tissue, the analysis was started on the basis of high intensity reaction areas. For each sample, 10 different areas were examined at a total enlargement of 200. The number of cells stained positively in each area was recorded and the average of these 10 sites was taken as the data of that animal.

Statistical Analysis

Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normal distribution of the groups. T-test was used for the evaluation of groups with normal distribution. Statistical Package for Social Sciences (SPSS) 20 Program was used in statistical tests.

RESULTS

The surfaces of the livers of the control group animals were smooth, glossy and brown in colour (Figure 1c). The macroscopic appearance of the livers of the rats in the sham group (Figure 1d) and silymarin group (Figure 1e) were similar to the Control Group. However, in the rats of DEN group, multifocal, (3-4 mm) and gray-yellow soft nodules in different diameters were seen on the surface of the liver (Figure 1a). The livers revealed also hemorrhages

on capsular surface. The rats of the DEN+silymarin Group showed nodular structures resembling to the animals in the DEN group (Figure 1b).

In the histopathological examination of livers from control (Figure 2c), sham (Figure 2d) and silymarin group (Figure 2e) the liver tissues were seen to retain its normal lobular and sinusoidal architecture, with a proper arrangement of hepatocyte plates. All hepatocytes were detected to be similar in size and shape. HCC was observed in the animals of the DEN group. Trabecular and acinar pattern were observed as dominant in the tumor tissue. In some areas only trabecular structures were observed, whereas in some areas only acinar structures were present. There were also some areas showing being mixed of these two patterns (Figure 2a). In animals treated with DEN+silymarin, HCC was diagnosed. In some areas only trabecular structures were observed, whereas in some areas only acinar structures were present. Similar to the DEN group, the common histopathological pattern was a

mix pattern with trabecular and acinar structures (Figure 2b).

The values of iNOS and NT immune positive cell numbers of all groups were given in Table 1. No immune positive staining was observed in control (Fig 3c), sham (Fig 3d), and silymarin (Fig 3e) groups. iNOS positive immunostaining in hepatocyte cytoplasm was observed in DEN (Fig 3a) and DEN+silymarin (Fig 3b) groups. The average value of the iNOS positive cell number detected in the DEN+silymarin group was found to be less than the DEN group, but the difference wasn't statistically significant ($p>0.05$). Similar to iNOS; NT immunoreactivity wasn't observed in the control (Fig 4c), sham (Fig 4d) and silymarin (Fig 4e) groups.

In the DEN group the average value of the intracytoplasmic localized NT immune positive cell number was higher than DEN+ Silymarin group (Fig 4a); while this decrease was observed in DEN + Silymarin group (Fig 4b), it wasn't statistically significant ($p>0.05$).

Table 1. Average iNOS and NT positive cell numbers for all groups

Groups	DEN Group ($\bar{x} \pm SE$) (n=10)	DEN + Silymarin Group ($\bar{x} \pm SE$) (n=10)	Control Group ($\bar{x} \pm SE$) (n=10)	Sham Group ($\bar{x} \pm SE$) (n=10)	Silymarin Group ($\bar{x} \pm SE$) (n=10)
iNOS	55.3 ± 7.46 ^a	42.9 ± 4.84 ^a	---	---	---
NT	52.9 ± 8.73 ^a	51.3 ± 9.26 ^a	---	---	---

* is equal to zero.

^aThere is no statistically difference between DEN and DEN + Silymarin groups ($p>0.05$).

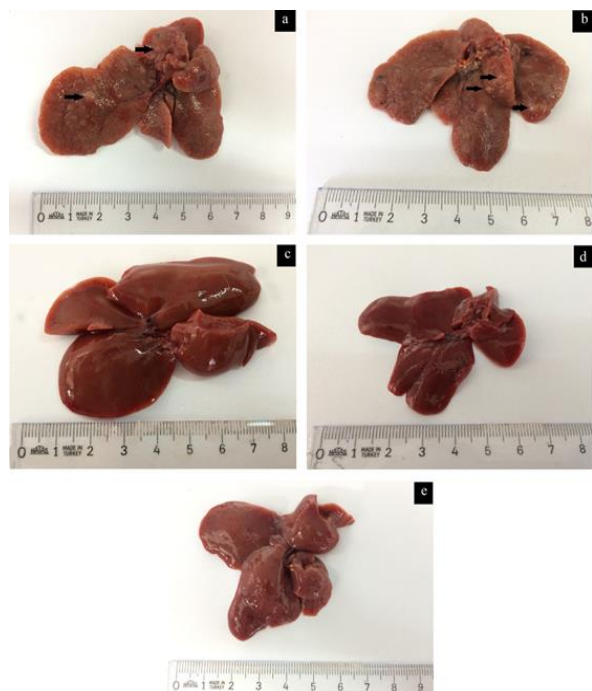


Figure 1. Liver, DEN Group, multifocal nodules (arrows) (a), DEN+Silymarin Group, multifocal nodules (arrows) (b), Control Group (c), Sham Group (d), Silymarin Group (e)

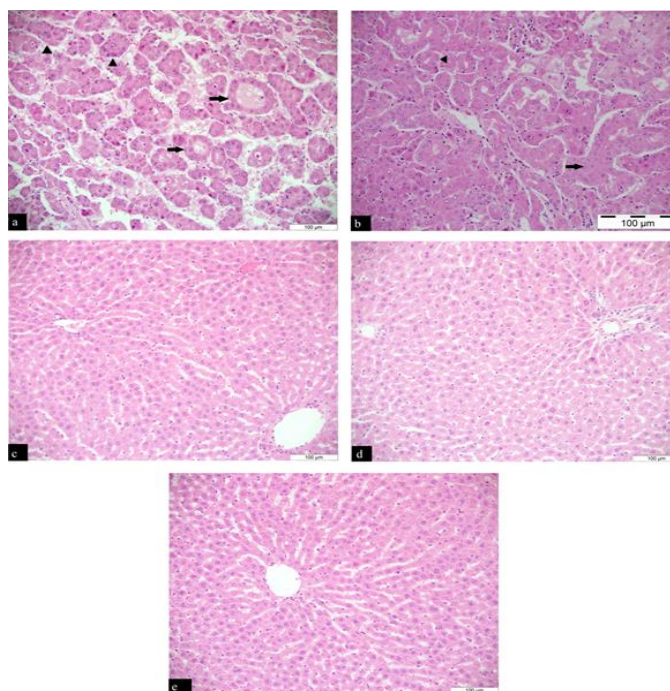


Figure 2. Liver, H&E, Bar=100 µm, DEN Group, trabecular (arrowheads) and acinar (arrows) structures (a), DEN+Silymarin group, trabecular (arrow) and acinar structure (arrowhead) (b), Control Group (c), Sham Group (d), Silymarin Group (e)

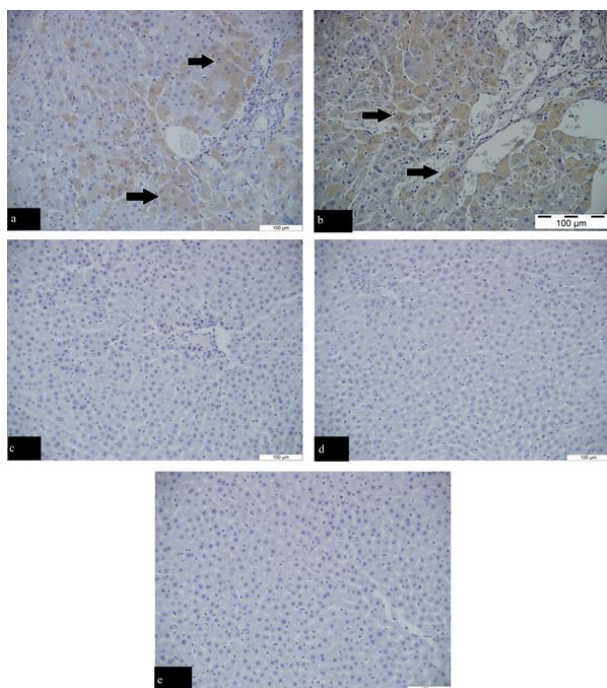


Figure 3. Liver, iNOS IHC, Bar= 100 µm, DEN Group, immunopositive hepatocytes (arrows) (a) DEN+Silymarin group, immunopositive hepatocytes (arrows) (b), Control Group (c), Sham Group (d), Silymarin Group (e)

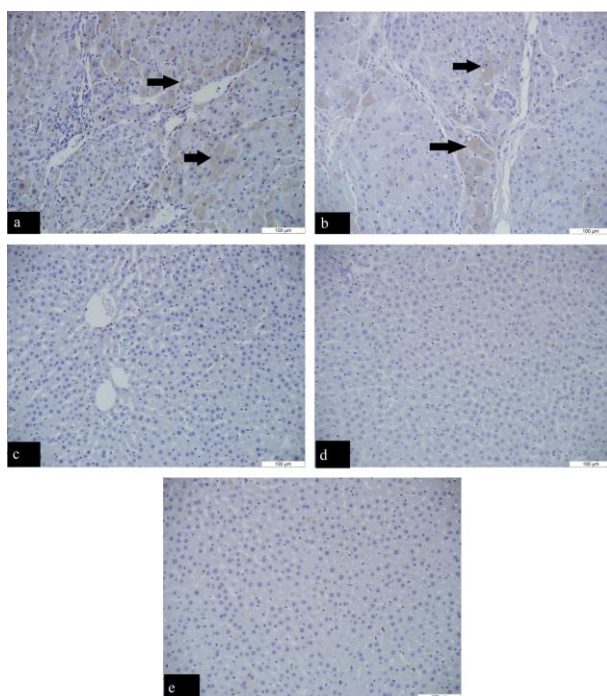


Figure 4. Liver, NT IHC, Bar= 100 µm, DEN Group, immunopositive hepatocytes (arrows) (a), DEN+Silymarin Group, immunopositive hepatocytes (arrows) (b), Control Group (c), Sham Group (d), Silymarin Group (e)

DISCUSSION

Nitric oxide (NO) is a highly reactive free radical and its half-life is only a few seconds. NO quickly combines with free radicals such as super oxide. In biological systems, it rapidly breaks down into nitrite and nitrate. In vivo reaction of NO with the super oxide radical produces peroxynitrite. Peroxynitrite causes nitrotyrosine by nitrating tyrosine residues in proteins (Sayılan Özgün

2013). Although super oxide and NO radicals are more resistant than peroxynitrite, peroxynitrite is more reactive than these radicals (Kayalı and Çakatay 2004). Peroxynitrite is very cytotoxic in high concentrations and causes oxidative damage in proteins, fats and DNA (Özkan and Yüksekol 2003; Özen et al. 2014). Nitrotyrosine is one of the most widely used markers in the detection of NO-dependent in vivo and oxidative protein damage due to the stable latest product of peroxynitrite oxidation (Kaya et al. 2012; Mis and Çilingir Yeltekin 2014). Bacterial lipopolysaccharide (LPS), inflammatory cytokines (IL-1B, TNF- α , IFN γ), as well as hypoxia and oxidative stress also cause an increase in the expression of iNOS and provide the synthesis of NO in the follow-up (Koç 2011). The iNOS enzyme has high activity and when it is induced, NO production is not short-termed and continues for hours or even days (Sayılan Özgün et al. 2014). In order for NO to react with the superoxide radical to form peroxynitrite, it must be produced in micromolar concentrations via iNOS (Cinel and Oral 2000). NO produced by iNOS which is an important free radical that triggers the inflammation process (Bishayee et al. 2010). Chronic inflammation and oxidative stress play an important role in the development of HCC (Bishayee et al. 2013). iNOS is an important indicator of oxidative stress and its suppression may be effective in regressing HCC development (Bishayee et al. 2010). Therefore, in our study, we aimed to determine the production of NO in liver tissue by immunohistochemical evaluation of iNOS expression.

Ahn et al. (1999) reported that the expression and immunohistochemical localization of iNOS and Nitrotyrosine in liver cancer model induced by DEN. According to Ahn et al. (1999) iNOS immunostaining has been observed in the bile duct epithelial cells, cells forming the ductus-like structures and in the benign character epithelial cells originating from the bile duct. Contrary to the low immunoreactivity in trabecular HCC and/or pseudoglandular HCC, intense staining in the cytoplasm of epithelial cells has been found in patients with glandular HCC. It has been determined that iNOS is extensively expressed in hepatocellular transitional or cholangiocellular phenotypes. In the HCC cases, there is also a high staining in newly formed capillar endothelial cells and the cytoplasm of oval-shaped cells forming ductular structures. In our study, iNOS immunopositive reactivity was observed in the cytoplasm of tumor cells forming trabecular and acinar structures. We demonstrated that there was no difference between the two patterns in terms of iNOS positive staining intensity. In other studies, it has been recorded that DEN administration causes an remarkable increase in the expression of iNOS (Zhao et al. 2008; Bishayee et al. 2010; Bishayee et al. 2013). In accordance with the literature datas (Ahn et al. 1999; Zhao et al. 2008; Bishayee et al. 2010; Bishayee et al. 2013), we observed that DEN administration increased the expression of iNOS in liver tissues. This increase was interpreted as chronic inflammation which plays a major role in HCC development by DEN administration and presence of oxidative stress.

Experimentally induced liver injury models (Tunca et al. 2009; Domitrović et al. 2011); the researchers have been investigated the antioxidative effects of Silymarin or its main component Silybin by immunohistochemical methods. It has been demonstrated that the administration of Silymarin or Silybin reduced the expression of iNOS. In our study, similar to the literature data (Tunca et al. 2009; Domitrović et al. 2011), Silymarin treatment decreased

iNOS expression compared to the DEN group, but this decrease was not statistically significant.

Nitrotyrosine is an important oxidative and nitrosative stress parameter (Kaya et al. 2012; Mis and Çilingir Yeltekin 2014). In our study, the immunohistochemical evaluation of nitrotyrosine was aimed to demonstrate the presence of peroxynitrite in liver tissue. There are limited number of studies in which nitrotyrosine expression and accumulation of peroxynitrite in tissues are determined by immunohistochemical methods in order to detect oxidative and nitrosative damage in liver cancer models induced by DEN administration (Bishayee et al. 2010; Thuy le et al. 2011; Bishayee et al. 2013). Thuy le et al. (2011) reported that they conducted the HCC model as a result of their DEN treatment (25 and 36 weeks). They determined the Nitrotyrosine reaction in both the cytoplasm and nucleus of tumor cells. In our study, we observed Nitrotyrosine immunoreactivity in the cytoplasm of tumor cells in a similar manner to this study. Parallel to literature data (Bishayee et al. 2010; Thuy le et al. 2011; Bishayee et al. 2013) in our study, there was a dramatic increase in Nitrotyrosine immune positive cell number in the DEN group compared to the Control group. This increase was interpreted as oxidative-nitrosative stress and protein damage due to DEN administration.

Experimentally induced liver damage models (Kaviarasan et al. 2008) the researchers have been reported that the administration of Silymarin and Silybin have reduced Nitrotyrosine expression by immunohistochemical methods. We determined that in accordance with literature data, the administration of Silymarin caused a decrease in Nitrotyrosine expression compared to the DEN group and it was shown a relatively liver-protective effect, but this effect didn't cause a significant reduction. This protective effect of Silymarin was thought to reduce the production of NO and super oxide radical, thus it prevented the formation of peroxynitrite in the liver tissues.

CONCLUSION

Our study clearly showed that intraperitoneal administration of DEN once per week for 20 weeks is very effective in inducing HCC in rats. At the same time, it was revealed that important oxidative and nitrosative stress markers such as iNOS and NT were remarkably increased in the DEN group compared to the Control group. This suggests that the ROS emerged during the bioactivation of DEN elevated excessively. We considered that ROS plays a main role in the carcinogenic effect of DEN. Silymarin didn't show a statistically significant protective effect in terms of iNOS and Nitrotyrosine expressions. Additionally, in our opinion, the reason Silymarin didn't show expected hepatoprotective effects, could be related to low bioavailability, difficulties in absorption and dissolution. It is clear that in order to have a higher effect of Silymarin, the administration route, dose, duration and the resolving agent need to be managed.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Research Fund of Kafkas University (Project Number: 2016-TS-08, PhD thesis).

REFERENCES

- Ahn B, Han BS, Kim DJ, Ohshima H (1999). Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*, 20 (7), 1337-1344.
- Ali F, Rahul, Naz F, Jyoti S, Siddique YH (2014). Protective effect of apigenin against N-nitrosodiethylamine (NDEA)-induced hepatotoxicity in albino rats. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 767, 13-20.
- Aparicio-Bautista DI, Pérez-Carreón JI, Gutiérrez-Nájera N, et al. (2013). Comparative proteomic analysis of thiol proteins in the liver after oxidative stress induced by diethylnitrosamine. *Biochim Biophys Acta*, 1834 (12), 2528-2538.
- Bishayee A, Barnes KF, Bhatia D, Darvesh AS, Carroll RT (2010). Resveratrol suppresses oxidative stress and inflammatory response in diethylnitrosamine-initiated rat hepatocarcinogenesis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 3 (6), 753-763.
- Bishayee A, Thoppil RJ, Darvesh AS, Ohanyan V, Meszaros JG, Bhatia D (2013). Pomegranate phytoconstituents blunt the inflammatory cascade in a chemically induced rodent model of hepatocellular carcinogenesis. *J Nutr Biochem*, 24 (1), 178-187.
- Cinel İ, Oral U (2000). Peroksinitrit ve Myokardium. *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2, 163-168.
- Domitrović R, Jakovac H, Blagojević G (2011). Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2, and iNOS expression in CCl(4)-intoxicated mice. *Toxicology*, 280 (1-2), 33-43.
- Ghosh D, Choudhury ST, Ghosh S et al. (2012). Nanocapsulated curcumin: oral chemopreventive formulation against diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rat. *Chem Biol Interact*, 195 (3), 206-214.
- Gupta P, Bansal MP, Koul A (2013). Lycopene modulates initiation of N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis: studies on chromosomal abnormalities, membrane fluidity and antioxidant defense system. *Chem Biol Interact*, 206 (2), 364-374.
- Kaviarasan S, Sundarapandiyar R, Anuradha CV (2008). Protective action of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed polyphenols against alcohol-induced protein and lipid damage in rat liver. *Cell Biol Toxicol*, 24 (5), 391-400.
- Kaya S, Eskiocak S, Tezel HA, et al. (2012). Kolorektal Kanserli Olgularda Oksidatif ve Nitrozatif Stres. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 10 (2), 57-63.
- Kayali R, Çakatay U (2004). Protein Oksidasyonunun Ana Mekanizmaları. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 35 (2), 83-89.
- Kim H, Hong MK, Choi H, Moon HS, Lee HJ (2015). Chemopreventive effects of korean red ginseng extract on rat hepatocarcinogenesis. *J Cancer*, 6 (1), 1-8.
- Koç A (2011). Raw 264.7 Makrofaj Hücrelerinde Nitrik Oksit Sentezi Üzerine L-karnitinin Etkisi. Doktora Tezi. T.C. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kumar AK, Vijayalakshmi K (2015). Protective effect of Punica granatum peel and Vitis vinifera seeds on DEN-induced oxidative stress and hepatocellular damage in rats. *Appl Biochem Biotechnol*, 175 (1), 410-420.
- Madrigal-Santillán E, Madrigal-Bujaidar E, Álvarez-González I, et al. (2014). Review of natural products with hepatoprotective effects. *World J Gastroenterol*, 20 (40), 14787-14804.
- Mis L, Çilingir Yeltekin A (2014). Apoptosis. *BEÜ Fen Bilimleri Dergisi*, 3 (1), 102-112.
- Özen H, Kamber U, Karaman M, et al. (2014). Histopathologic, biochemical and genotoxic investigations on chronic sodium nitrite toxicity in mice. *Exp Toxicol Pathol*, 66 (8), 367-375.
- Özkan M, Yüksesol İ (2003). Nitrik Oksit ve Akciğerler. *Toraks Dergisi*, 4 (1), 88-94.
- Razavi-Azarkhiavi K, Ali-Omrani M, Solgi R et al. (2014). Silymarin alleviates bleomycin-induced pulmonary toxicity and lipid peroxidation in mice. *Pharm Biol*, 52 (10), 1267-1271.
- Sayılan Özgün G (2013). Streptozotosin ile Diyabet Geliştirilmiş Sıçanlarda Nitrik Oksit Metabolizmasının İncelenmesi. Doktora Tezi. T.C. Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı, Edirne.
- Sayılan Özgün G, Özgün E, Eskiocak S, Süt N (2014). Streptozotosin ile diyabet oluşturulmuş sıçanlarda L-karnitin nitrik oksit metabolizması üzerine etkisi. *Turk J Biochem*, 39 (4), 416-421.
- Shaarawy SM, Tohamy AA, Elgendy SM, et al. (2009). Protective effects of garlic and silymarin on NDEA-induced rats hepatotoxicity. *Int J Biol Sci*, 5 (6), 549-557.
- Shirakami Y, Gottesman ME, Blaner WS (2012). Diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis is suppressed in lecithin:retinol acyltransferase-deficient mice primarily through retinoid actions

immediately after carcinogen administration. *Carcinogenesis*, 33 (2), 268-274.

Thuy le TT, Morita T, Yoshida K, et al. (2011). Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol*, 179 (2), 1050-1060.

Tunca R, Sozmen M, Citil M, Karapehlivan M, Erginsoy S, Yapar K (2009). Pyridine induction of cytochrome P450 1A1, iNOS and metallothionein in Syrian hamsters and protective effects of silymarin. *Exp Toxicol Pathol*, 61 (3), 243-255.

Zhao X, Zhang JJ, Wang X, Bu XY, Lou YQ, Zhang GL (2008). Effect of berberine on hepatocyte proliferation, inducible nitric oxide synthase expression, cytochrome P450 2E1 and 1A2 activities in diethylnitrosamine- and phenobarbital-treated rats. *Biomed Pharmacother*, 62 (9), 567-572.



Influence of Oral Melatonin Administration on Oxidative Stress and Intestinal Microflora in Rats Exposed to Cadmium

Hakan TAVŞANLI¹ İhsan KISADERE²

¹ Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Public Health, Balıkesir, Turkey

² Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Balıkesir, Turkey

Received: 05.02.2020

Accepted: 11.05.2020

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effects of oral melatonin treatment on oxidative stress and intestinal microflora in rats exposed to chronic cadmium. Healthy 32 adult male albino Wistar rats were randomly divided into four groups as control (C; n=8), cadmium (Cd; n=8), melatonin (Mlt, n=8), cadmium + melatonin (Cd + Mlt; n=8). Mlt (100 mg/kg) was orally administered 5 times (Mlt and Cd + Mlt), and CdCl₂ (2 mg/day) 3 times a week for 4 weeks to rats (Cd and Cd + Mlt). After the treatments, serum total antioxidant status (TAS), total oxidant (TOS) levels as well as plasma ALT, AST, GGT, T.pro, Alb and BUN values were measured. Intestinal contents were aseptically collected, and *Enterobacteriaceae*, *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. counts were performed. As a result, serum TOS levels were defined higher in Cd group than other groups ($P < 0.05$). *Lactococcus* spp. counts decreased as 0.63 log in Cd group compared to C in small intestine, however it increased as 1.15 log in Cd + Mlt group. In conclusion, Cd + Mlt chelate was found beneficial for intestinal microflora due to suppressed the *Enterobacteriaceae* growth, however ameliorated the Cd induced oxidative stress and *Lactobacillus* spp./*Lactococcus* spp. rates in the different part of the intestine.

Keywords: Cadmium, Melatonin, Microflora, Oxidative Stress, Rat

ÖZ

Kadmiyuma Maruz Kalan Ratlarda Oral Melatonin Uygulamasının Oksidatif Stres ve Bağırsak Mikrobiyotası Üzerine Etkisi

Bu çalışmanın amacı, kronik kadmiyuma maruz kalan ratlarda oral melatonin uygulamasının, oksidatif stres ve bağırsak mikrobiyotasında bulunan bazı mikroorganizmalar üzerine etkilerini araştırmaktır. Sağlıklı 32 yetişkin erkek albino Wistar rat, kontrol (C; n=8), kadmiyum (Cd; n=8), melatonin (Mlt, n=8), kadmiyum + melatonin (Cd + Mlt; n=8) olarak rastgele dört gruba ayrılmıştır. Ratlara oral yolla Mlt (100 mg/kg), (Cd ve Cd + Mlt) haftada 5 kez (Mlt ve Cd + Mlt) ve CdCl₂ (2 mg/gün) 3 kez olmak üzere 4 hafta boyunca uygulanmıştır. Uygulamadan sonra serum total antioksidan seviyeleri (TAS), total oksidan (TOS) düzeyleri ile plazma ALT, AST, GGT, T.pro, Alb ve BUN değerleri ölçülmüştür. Ayrıca ince ve kalın bağırsak içerikleri ayrı ayrı aseptik olarak alınarak bağırsak florasında *Enterobacteriaceae*, *Lactococcus* spp. ve *Lactobacillus* spp. sayımları yapılmıştır. Bulgu olarak, serum TOS düzeyleri Cd grubunda diğer gruplara göre daha yüksek olarak tanımlanmıştır ($P < 0,05$). Cd grubunda ince bağırsak florasında *Lactococcus* spp. sayısı C grubuna göre 0,63 log azalırken, Cd + Mlt grubunda 1,15 log artmıştır. Sonuç olarak, Cd + Mlt şelatının *Enterobacteriaceae* üremesini baskılanması, *Lactobacillus* spp./*Lactococcus* spp. oranını düzenlemesi ve Cd'a bağlı gelişen oksidatif stresi azaltması nedeni ile intestinal mikroflora için faydalı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Melatonin, Mikroflora, Oksidatif Stres, Rat

INTRODUCTION

Cadmium (Cd) is, a toxic heavy metal, an important environmental pollutant that widely distributed in agricultural and industrial areas, especially in the atmosphere (Cook et al. 1994). It has been used in industrial area as an anti-corrosive agent for steel, iron and other composites. The main source of exposure to the toxic and carcinogenic (as a group I carcinogen) this metal

are heating Cd-containing materials such as smelting and electroplating, using of paint pigments and cadmium-nickel batteries, and also living close to extensive industrial areas. Generally, human are mostly exposed to Cd through the intake of contaminated water, food (especially vegetables) or air as well as inhalation of tobacco smoke (Goyer et al. 1986; WHO 1993; ATSDR 1999).



Although long-term exposure to Cd causes many toxic effects in various organ and systems such as brain, lung, bones, immune, haemopoietic, endocrine, cardiovascular and reproductive in human and animals, it mainly accumulates in the kidney/liver tissues and impairs their functions. These disturbances lead to elevation of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and blood urea nitrogen (BUN) levels which are indicator markers of the tissue damage in the blood. It is also affected the plasma protein synthesis and rates. Besides, Cd is known to cause oxidative stress by increasing lipid peroxidation and/or by changing intracellular antioxidant/oxidant rates (Figueiredo-Pereira et al. 1998; Fowler 2009; Satarug et al. 2010).

The gastrointestinal (GI) tract is susceptible to the attacks of foreign harmful substances which orally ingested. In the normal microflora of GI tract, there is an important relationship between the bacteria population and the intestinal epithelial cells which is known as symbiosis. It play a critical role for health of the organism due to improving the microbial balance, detoxification and elimination of harmful compounds such as heavy metals from the system by removing through precipitation. The presence of commensal bacteria in the intestinal tract also provides the first barrier of defense against pathogenic bacteria. Imbalance in the relationship among the intestinal epithelial cells, pathogen and/or commensal bacteria population causes GI disorders (Tancrede 1992; Bengmark 1997; Hooper et al. 2001; Eckburg et al. 2005). Heavy metals such as mercury (Hg), cadmium (Cd), arsenic (As), chromium (Cr), thallium (Tl), lead (Pb) and pathogens reach GI tract through ingestion of contaminated food and water (Upreti et al. 2004; Inaba et al. 2005; Monachese et al. 2012). However, the toxicological effect of heavy metals, especially Cd, on GI microflora, is still remains unclear.

In recent years, it has been enounced that the harmful effects of Cd can be ameliorated by using some substances which have antioxidant and metal binding properties. Many chelating agents, antioxidants and vitamins have been used to lessen oxidative stress and also tissue damage due to Cd (Pourmorad et al. 2006; Fang 2007; Karabulut-Bulan et al. 2008; El-Boshy et al. 2014). One of them is Mlt (n-acetyl-5-methoxytryptamine) is a hormone secreted from the pineal gland, accepted as a powerful antioxidant and free radical consumer substance due to its lipophilic properties. In addition, it has metal binding properties, and regulatory effect on the intestinal microflora which was also determined, recently (Reiter et al. 2000; Karbownik et al. 2001; Zhu et al. 2018).

Therefore, the present study has been designed to evaluate the effects of oral Mlt treatment on oxidative stress and intestinal microflora in rats exposed to chronic cadmium toxication.

MATERIALS and METHODS

Animals

In study, healthy 32 adult male albino Wistar rats (body weight $\sim 200 \pm 30$ g) were used. During the experiment, rats were housed in standard plastic rat cages (at $23 \pm 2^\circ\text{C}$ room temperature, $55 \pm 10\%$ relative humidity, 12 hours night/day light period) and fed with ad-libitum standard rat feed. The animals also had fresh drinking water during the experiment. All experimental procedures were approved by the Ethical Committee on Animal

Experimentation of the University of Balıkesir (Turkey, project code number 2019/4-6).

Study Design and Experimental Procedure

After acclimatization, animals were randomly divided into four groups as control (C; n=8), cadmium (Cd; n=8), melatonin (Mlt, n=8), cadmium + melatonin (Cd + Mlt; n=8), and following applications were performed;

Control Group (C): Standard rat feed and fresh drinking water were given to rats ad libitum throughout the experiment.

Cadmium Group (Cd): Cadmium chloride (CdCl_2) (2 mg/day) were orally administered to rats 3 times a week for 4 weeks.

Melatonin Group (Mlt): Melatonin (100 mg/kg) was orally administered to rats 5 times a week for 4 weeks.

Cadmium + Melatonin (Cd+Mlt): Melatonin (100 mg/kg) was orally administered 5 times a week, and cadmium chloride (2 mg/day) was administered 3 times a week for 4 weeks.

At the end of the experiment (4 weeks later), the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (0.1 ml/ 100 mg/body weight) and sacrificed by cervical dislocation technique. Cardiac blood samples were taken via cardiac puncture under the general anesthesia, and collected into heparinized and normal tubes. Plasma and serum samples were separated from the blood samples using a centrifuge (3000 rpm, 25 min, Heichrich, Germany). Obtained plasma and serum samples were stored at minus 80°C in a refrigerator until analysis time.

Determination of total antioxidant and oxidants levels

Serum total antioxidant status (TAS) and oxidant status (TOS) levels were measured by ELISA (Thermoscientific Elisa Reader, USA) using commercial kits (Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Turkey), according to Erel's method which is automated and colorimetric (Erel 2004, 2005).

Determination of some plasma enzyme levels

Plasma alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), total protein (T.pro), albumine (Alb) and blood urea nitrogen (BUN) values were measured by using biochemical analyser (Architect C-8000, Abbott, USA) with commercial kits according to prospectus of manufacturer.

Microbiological analysis

During the necropsy, 1 g intestinal fluid content were aseptically collected from the small and large intestines of the each rats (separately with 3 replicates). Then, they were homogenized in the stomacher for 2 minutes with sterile 9 ml Maximum Recovery Diluent (MRD), serial dilutions were prepared from 10^{-1} to 10^{-6} . For determine to the *Enterobacteriaceae* count, 1 ml of the dilution was taken and cultured in VRB (Oxoid CM1082) Agar according to the double-plate technique. The plates were evaluated as *Enterobacteriaceae* because of the observing purple-pink colonies after aerobic incubation at 37°C for 24 hours (Osman et al. 2006). On the other hand, 0.1 ml of the dilution was taken and cultured in the M17 (Oxoid CM0785) agar according to spread plate technique for despite to *Lactococcus* spp. count. Then, plates were evaluated as *Lactococcus* spp. depends on occurring yellow-cream colonies after anaerobic incubation at 30°C for 24 hours (Lee et al. 2010). For detection of *Lactobacillus* spp count, 0.1 ml of dilution was cultured on MRS (CM0361) agar. Plates were also evaluated as *Lactobacillus* spp. due

to occurring of yellow-cream colonies after anaerobic incubation at 37°C for 72 hours (Bauer et al. 2002).

Statistical Analysis

Statistical differences among the groups were tested by analysis of variance (ANOVA) which is followed by Duncan's test using SPSS for Windows version 25.0.

RESULTS

Serum TOS levels were defined higher in Cd group than other experimental groups ($P < 0.05$). Mlt treatment alone positive affected the TAS levels in Mlt group animals when compared to C, Cd + Mlt and Cd groups ($P < 0.05$), shown in Table 1. Plasma ALT, AST, GGT and BUN enzyme levels were detected higher in Cd group when compared to other experimental groups ($P < 0.05$), shown in Table 2. Above-mentioned enzyme levels decreased due to Mlt administration in Mlt and Cd + Mlt group animals ($P < 0.05$). Besides, T. pro and Alb levels were found the lowest in Cd group when compared the other groups ($P < 0.05$). Administration of Mlt didn't lead to significant change in the T. pro and Alb values in present study. In the small and large intestines of the control group rats, *Enterobacteriaceae*, *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. counts were detected as 4.34, 4.25 log cfu / g; 6.47, 7.09 log cfu / g and 8.37, 8.63 log cfu / g, respectively. Although

the count of *Enterobacteriaceae* was defined similar in C, Mlt and Cd groups, a significant decrease was found in the Cd + Mlt group in the small intestine ($P < 0.01$). In terms of the count of *Enterobacteriaceae* in the large intestine, there was not any significant difference among the C, Mlt and Cd + Mlt, it was found a significant difference in Cd group animals ($P < 0.01$). Although there was not a significant difference between the C and Mlt groups in terms of *Lactococcus* spp. count in the small intestine, it was determined a significant difference between the Cd and Cd + Mlt group animals when compared the control group ($P < 0.01$), shown in Table 3. In addition, a significant decrease in the count of *Lactococcus* spp. was observed in the Cd group, however an increase in the Cd + Mlt group in the small intestine of the rats. On the other hand, *Lactococcus* spp. count was found similar in C and Cd groups in the large intestine of the rats, there was a significant difference between the Mlt/Cd + Mlt and C groups ($P < 0.01$). There was a significant difference between the C and the other experimental groups according to *Lactobacillus* spp. count in the small intestine of the rats ($P < 0.01$). When the large intestines were evaluated, it was found that there was a significant difference between the C group and Cd + Mlt group according to *Lactobacillus* spp. count ($P < 0.01$).

Table 1. Serum TAS and TOS values of the rats in different experimental groups

Groups				
Parameters	C (n=8)	Mlt (n=8)	Cd (n=8)	Cd + Mlt (n=8)
TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)	23.852 \pm 6.860 ^{ab}	17.172 \pm 1.996 ^b	39.473 \pm 7.380 ^a	37.042 \pm 4.832 ^{ab}
TAS (mmolTrolox Eq/L)	1.743 \pm 0.016 ^b	1.791 \pm 0.015 ^a	1.027 \pm 0.007 ^d	1.698 \pm 0.177 ^c

a,b,c; The differences between average values indicated by different letters in the same row of the same parameters are important ($p < 0.05$).

Table 2. The average plasma ALT, AST, GGT, total protein, albumine and BUN levels in experimental groups (X \pm SEM)

Parameters	Groups			
	C (n=8)	Mlt (n=8)	Cd (n=8)	Cd + Mlt (n=8)
T.Protein (g/dL)	5.58 \pm 0.14 ^a	5.21 \pm 0.14 ^a	4.57 \pm 0.16 ^b	5.13 \pm 0.10 ^a
ALT (U/L)	37.83 \pm 1.95 ^c	37.66 \pm 1.20 ^c	81.00 \pm 5.17 ^a	72.82 \pm 4.74 ^b
AST (U/L)	60.16 \pm 4.03 ^c	62.16 \pm 5.17 ^c	147.0 \pm 16.82 ^a	107.16 \pm 9.88 ^b
GGT (U/L)	1.16 \pm 0.11 ^c	1.15 \pm 0.12 ^c	2.50 \pm 0.23 ^a	1.40 \pm 0.24 ^b
Albumine (g/dL)	3.50 \pm 0.10 ^a	3.52 \pm 0.14 ^a	2.85 \pm 0.22 ^b	3.54 \pm 0.91 ^a
BUN (mg/dl)	18.71 \pm 1.22 ^c	16.10 \pm 1.34 ^d	40.72 \pm 2.26 ^a	30.27 \pm 2.25 ^b

a,b,c,d; The differences between average values indicated by different letters in the same row of the same parameters are important ($p < 0.05$).

Table 3. The average counts of *Enterobacteriaceae*, *Lactococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. in different parts of the rat intestine

Groups	Intestine	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Lactococcus</i> spp.	<i>Lactobacillus</i> spp
Control (n:8)	Small	4.34±0.08 ^{ab}	6.47±0.00 ^{bc}	8.37±0.46 ^{ab}
	Large	4.25±0.00 ^{ab}	7.09±0.34 ^{bc}	8.63±0.27 ^a
Melatonin (n:8)	Small	4.36±0.46 ^{ab}	6.20±0.36 ^{bc}	8.12±0.13 ^{abc}
	Large	5.03±0.56 ^{ab}	8.76±0.36 ^a	8.69±0.39 ^a
Cadmium (n:8)	Small	4.68±0.51 ^{ab}	5.84±0.53 ^c	6.99±0.45 ^d
	Large	5.37±0.49 ^a	6.32±0.27 ^{bc}	7.39±0.22 ^{bcd}
Cadmium+Melatonin (n:8)	Small	3.56±0.28 ^b	7.62±0.38 ^{ab}	7.25±0.27 ^{cd}
	Large	4.30±0.35 ^{ab}	7.40±0.24 ^b	8.48±0.06 ^{ab}

a,b,c,d; The differences between average values indicated by different letters in the same column of the same parameters are important ($p < 0.05$)

DISCUSSION

Although there are many studies about the toxicological effect of heavy metals, especially Cd, on different tissues (liver, kidney and brain) in human and animal body, influences of Cd on GI microflora and its relationship with oxidative stress is still unclear depend on the limited investigations (Gerhardsson et al. 2002; Satarug et al. 2003; Kocak and Akcil 2006; Karabulut-Bulan et al. 2008).

In our study, serum TOS levels were defined higher in Cd group than other experimental groups. Similarly, Cd induced increased blood TOS levels were also detected by Andjelkovic et al. (2019) in a previous study. In addition, exposure the Cd reduced TAS and GSH levels, however increased LPO, H₂O₂, TOS, OSI values in sublingual gland and kidney tissue samples which were reported by Kumas et al. (2016) and Kostecka-Sochoń et al. (2018). Influence of acute and chronic Cd toxicity on another important antioxidant/oxidant system parameters such as SOD, GSH and Catalase were also defined by other researchers which was similar with our results, previously (Renugadevi et al. 2010; Bu et al. 2013; Kanter et al. 2013). On the other hand, Mlt (which is a known antioxidant and free radical scavenger) treatment alone positive affected the antioxidant capacity (TAS) in Mlt group animals when compared to C, Cd + Mlt and Cd groups in present study. It has been reported that treatment of Mlt to chronically Cd exposed male Sprague-Dawley rats for 3 months also decreased the MDA levels, but increased SOD, CAT and GSH-Px activities in a previous study (Kaplan et al. 2008). Positive effects of Mlt treatment on Cd induced oxidative damage also confirmed by other researchers (Eybl et al. 2006; El-Sokkary et al. 2009; Shagirtha et al. 2011). It can be considered that the treatment of Mlt ameliorated the Cd induced oxidative stress in present study.

In our study, an important indicators of liver and kidney functions are plasma ALT, AST, GGT and BUN enzyme levels were detected higher in Cd group when compared to other experimental groups which were corresponding with previous studies (Renugadevi et al. 2009; Lakshmi et al. 2012; Kisadere et al. 2019). On the other hand, above-mentioned enzyme levels decreased due to Mlt administration in Mlt and Cd + Mlt group animals in present study. These results were consistent with Alabbassi et al. (2008) and Hussein et al. (2014). Besides, T.pro and Alb levels were found the lowest in Cd group in

this study. It was corresponding with Zohouri and Tekeli (1999), Hussein et al. (2009) and Oyinloye et al (2016). Increased liver and kidney enzyme levels, and reduction of T.pro and Alb values confirm the tissue damage due to chronic Cd accumulation and toxicity in present study. Administration of Mlt didn't lead to significant change on the T.pro and Alb values, however increased the BUN, ALT, AST and GGT levels in Cd + Mel groups when compared the other groups. It can be explained that Mlt may be partially tolerated the Cd accumulation and toxicity in the liver.

In the small intestinal microflora of the rats, neither Cd nor Mlt didn't cause any significant changes in the counts of *Enterobacteriaceae* in present study. On the other hand, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., which are the members of *Enterobacteriaceae* group, counts were detected sharply decreased due to exposed the different high doses of Cd for 45 days in the small intestine of the mouse by Fazeli et al. (2011). Interestingly, *Enterobacteriaceae* count was detected the lowest in Cd + Mlt group when compared to other experimental groups (C, Cd and Mlt) in small intestines in our study. The reductional effect of Cd + Mlt on *Enterobacteriaceae* counts can be explained by either direct antimicrobial effect of chelate or by decreasing the absorption/absorption rate of Cd, and tissue oxidative stress with prolonging the residence time of Cd in the small intestine. In present study, elevated serum antioxidant and decreased oxidant levels can be also confirmed this findings (Chweatiuk et al. 2006). Besides, Cd treatment led to increase *Enterobacteriaceae* count in large intestine in Cd group animals when compared to C group. It has been reported that *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. counts decreased in the large intestine of the mice due to Cd administration in a previous study which was inconsistent with our study (Fazeli et al. 2011). Although it has been suggested that Mlt regulates the all intestinal microbial flora and thus improving intestinal health in previous studies, it was not observed a significant change in *Enterobacteriaceae* counts in large intestine of the Mlt/Cd + Mlt group animals (Zhu et al. 2018). These differences can be occurred due to different dose, time of exposure to Cd and/or animal species. In addition, the count of *Enterobacteriaceae* in the Cd + Mlt group was similar with the C group in our study. It is indicated that the chelate stabilizes the Cd-induced tissue/serum oxidative stress, and the increase of *Enterobacteriaceae* count in the Cd group is thought to be due to the lack of Cd absorption from the large intestines, therefore the

oxidative stress formed is a suitable environment for the growth of harmful bacteria.

A significant decrease was defined in the count of *Lactococcus* spp. in both the small and large intestines in Cd group animals in present study. In addition, an important increase was detected in the Cd + Mlt group in both intestines in our study. It was also reported by Fazeli et al. (2011) that gram-positive basilcus and enterococcus microorganisms were more sensitive to Cd toxicity than gram-negative *E.coli* and *Klepsiella* species. These results can be explained by the fact that total bacterial rates of microflora varied with decreased count of *Enterobacteriaceae* due to Cd + Mlt administration or the high pH in the small intestine (Glombitza 2001; Marrero et al. 2004).

Lactobacillus spp. count was found lower in Cd group than C, Mlt and Cd + Mlt groups in small intestine microflora of the rats in our study. It has been reported by Fazeli et al. (2011) that *Lactobacillus* spp. count decreased due to different high doses of Cd treatment in small intestines of the mice which was corresponding with our results. Although decreased *Lactobacillus* spp. counts were detected by Fazeli et al (2011) in large intestines depend on the different doses of Cd, it increased due to Mlt and Cd + Mlt treatments in large intestine of the rats except C group in our study. It was also reported that Mlt treatment increased the *Lactobacillus* spp. counts in large intestines of colitic mice which was consistent with present study (Zhu et al. 2018). It can be also expressed that Cd + Mlt treatment may be reduced *Enterobacteriaceae* count and lead to increase *Lactobacillus* spp./*Lactococcus* spp. rates, and/or activated the antioxidant system that can be confirmed by an increase in serum TAS levels in our study (Djurasevic et al. 2016).

CONCLUSION

Although *Lactococcus* spp. counts decreased 0.63 log in Cd group compared to C group in small intestine of the rats, it increased as 1.15 log in Cd + Mlt group. In addition, Cd + Mlt showed a lower antimicrobial effect on *Lactobacillus* spp. than Cd in the small intestine. The effect of the Cd + Mlt treatment on lactic acid bacteria in the small intestine showed that Cd + Mlt chelate can be beneficial for intestinal microflora due to suppressed the *Enterobacteriaceae* growth, however ameliorated the Cd induced oxidative stress and *Lactobacillus* spp./*Lactococcus* spp. rates in the different part of the intestine.

CONFLICT of INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1999). Toxicology profile for cadmium. Atlanta, GA: Department of Health and Human Services, Public Health Service; p. 258.
- Alabbassi MG, Hussain SA, Shatha HA (2008). Therapeutic effects of melatonin in lead-induced toxicity in rats. *Iraqi J Pharm Sci*, 17, 47-54.
- Andjelkovic M, Djordjevic AB, Antonijevic E, Antonijevic B, et al. (2019). Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney. *Int J Environ Res*, 16(2), 274.
- Bauer TM, Fernández J, Navasa M, Vila J, et al. (2002). Failure of *Lactobacillus* spp. to prevent bacterial translocation in a rat model of experimental cirrhosis. *J hepatol*, 36(4), 501-506.
- Bengmark S (1998). Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 42, 2-7.
- Bu T, Mi Y, Zeng W, Zhang C (2013). Protective effect of quercetin on cadmium-induced oxidative toxicity on germ cells in male mice. *Anat Rec*, 294 (3), 520-26.
- Chweatiuk E, Wostowski T, Krasowska A, Bonda E (2006). The effect of orally administered melatonin on tissue accumulation and toxicity of cadmium in mice. *J Trace Elem Med Biol* 19, 259-265.
- Cook CM, Sgardelis SP, Pantis JD, Lanaras T (1994). Concentrations of Pb, Zn, and Cu in *Taraxacum* spp. in relation to urban pollution. *Bull Environ Contam Toxicol*, 53, 204-210.
- Zhu D, Ma Y, Ding S, Jiang H, (2018). Effects of melatonin on intestinal microbiota and oxidative stress in colitis mice. *BioMed Res Int*, Article ID 2607679, 6.
- Djurasevic S, Jama A, Jasnica N, et al (2016). The protective effects of probiotic bacteria on cadmium toxicity in rats. *J Med Food*, 00 (0), 1-8.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308,1635-1638.
- El-boshy ME, Risha EF, Abdelhamid FM, et al. (2014). Protective effects of selenium against cadmium induced hematological disturbances, immunosuppressive, oxidative stress and hepatorenal damage in rats. *J Trace Elem Med Biol*, 29, 104-10.
- El-Sokkary GH, Nafady AA, Shabash EH (2009). Melatonin ameliorates cadmium-induced oxidative damage and morphological changes in the kidney of rat. *The Open Neuroendocrin J*, 2, 1-9 1.
- 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, 277-285.
- Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin biochem*, 38, 1103-1111.
- Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J (2006). Comparative study of natural antioxidants - curcumin, resveratrol and melatonin- in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology*, 225, 150-6.
- Fang C (2007). Characterization of polyphenol oxidase and antioxidants from pawpaw (*asimina tribola*) fruit. University of Kentucky Master's Theses.
- Fazeli M, Hassanzadeh P, Alaei S (2011). Cadmium chloride exhibits a profound toxic effect on bacterial microflora of the mice gastrointestinal tract. *Hum Exp Toxicol*, 30, 152.
- Figueredo-Pereira ME, Yakushin S, Cohen G (1998). Disruption of the Intracellular Sulphydryl Homeostasis by Cadmium-induced Oxidative Stress Leads to Protein Thiolation and Ubiquitination in Neuronal Cells. *J Biol Chem*, 273 (21), 12703-12709.
- Fowler BA (2009). Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review. *Toxicol Applied Pharma*, 238, 294-300.
- Gerhardsson LLU, Englyst V, Lundstrom NG, et al. (2002). Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol*, 16(4), 261-66.
- Glombitza F (2001). Treatment of acid lignite mine flooding water by means of microbial sulfate reduction. *Waste Manag*, 21, 197-203.
- Goyer RA (1986). Toxic effects of metals. In: Klassen CD, Amdur MO, Doull J, editors. Casarett and Doull's toxicology. Macmillan Publishing p.592-6. New York.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A et al. (2001). Molecular analysis of commensal hostmicrobial relationships in the intestine. *Science* 2: 881-884.
- Hussein SA, Abd-el-maksoud HA, Agag BI, El-nile MB (2009). Effect of cadmium toxicity on some biochemical blood parameters and their modulation with certain natural antioxidants in rabbits. *Benha Ras Surd*, 338-62.
- Hussein SA, Hassanein MRR, Ali AH (2014). Protective effects of alpha-lipoic acid against lead-induced oxidative stress in erythrocytes of rats. *Benha Vet Med J*, 27(2), 382-395.
- Inaba T, Kobayashi E, Suwazono Y et al. (2005). Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicol Lett*, 159, 192-201.
- Kanter M, Unsal C, Aktas C, Erboğa M (2013). Neuroprotective effect of quercetin against oxidative damage and neuronal apoptosis caused by cadmium in hippocampus. *Toxicol Ind Health* 32(3), 541-50.
- Kaplan M, Atakan IH, Aydoğdu N, et al. (2008). Influence of N-acetylcysteine on renal toxicity of cadmium in rats. *Pediatr Nephrol*, 23, 233-41.
- Karabulut-Bulan O, Bolkent S, Yanardag R (2008). The role of vitamin C, vitamin E, and selenium on cadmium-induced renal toxicity of rats. *Drug Chem Toxicol*, 31(4), 413-26.
- Karbownik M, Gitto E, Lewinski A, Reiter RJ (2001). Induction of lipid peroxidation in hamster organs by the carcinogen cadmium: melioration by melatonin. *Cell Biol Toxicol*, 17, 33-40.
- Kisadere I, Donmez N (2019). The effects of quercetin on antioxidant system and some blood parameters in rats exposed to acute cadmium toxicity. *Eurasian J Vet Sci*, 35 (2), 66-70.
- Kocak M, Akcil E (2006). The effects of chronic cadmium toxicity on the hemostatic system. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 35(6), 411-16.

- Kostecka-Sochoń P, Onopiuk BM, Dąbrowska E (2018).** Protective Effect of Increased Zinc Supply against Oxidative Damage of Sublingual Gland in Chronic Exposure to Cadmium: Experimental Study on Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2018; Article ID 3732842, 8.
- Kumas M, Esrefoglu M, Bayindir N et al (2016).** Protective Effects of Curcumin on Cadmium-Induced Renal Injury in Young and Aged Rats. *Bezmialem Science* 3, 92-8.
- Lakshmi GD, Kumar PR, Bharavi K et al. (2012).** Protective effect of *Tribulus terrestris* linn on liver and kidney in cadmium intoxicated rats. *Indian J Exp Biol*, 50, 141-146.
- Lee KC, Liu CF, Lin TH, Pan TM (2010).** Safety and risk assessment of the genetically modified *Lactococci* on rats intestinal bacterial flora. *Int J Food Microbiol*, 142(1-2), 164-169.
- Marrero J, Gonzalez LJ, Sánchez A et al (2004).** Effect of high concentration of Co (II) on *Enterobacter liquefaciens* strain C-1: a bacterium highly resistant to heavy metals with an unknown genome. *Proteomics*, 4, 1265-1279.
- Monachese M, Burton JP, Reid G (2012).** Bioremediation and tolerance of humans to heavy metals through microbial processes: a potential role for probiotics? *Appl Environ Microbiol*, 78, 6397-6404.
- Osman N, Adawi D, Molin G et al. (2006).** *Bifidobacterium infantis* strains with and without a combination of oligofructose and inulin (OFI) attenuate inflammation in DSS-induced colitis in rats. *Bmc Gastroenterology* 6(1), 31.
- Oyinloye BE, Ajiboye BO, Ojo OA et al. (2016).** Ameliorative potential of *Aframomum melegueta* extract in cadmium- induced hepatic damage and oxidative stress in male Wistar rats. *J Appl Pharm Sci*, 6, 94-99.
- Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N (2006).** Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *Afr J Biotechnol*, 5 (11), 1142-45.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gatto E (2000).** Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*, 7, 444-58.
- Renugadevi J, Milton prabu S (2010).** Quercetin protects against oxidative stress-related renal dysfunction by cadmium in rats. *Exp Toxicol Pathol* 62(5), 471, 81.
- Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S et al. (2003).** A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett*, 137(1-2), 65-83.
- Satarug S, Garrett SH, Sens MA, Sens DA (2010).** Cadmium, environmental exposure, and health outcomes. *Environ Health Perspect*, 118, 182-190.
- Shagirtha K, Muthumani M, Prabu SM (2011).** Melatonin abrogates cadmium induced oxidative stress related neurotoxicity in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 15, 1039-1050.
- Tancrede C (1992).** Role of human microflora in health and disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11, 1012-1015.
- Upreti RK, Shrivastava R, Chaturvedi UC (2004).** Gut microflora & toxic metals: chromium as a model. *Indian J Med Res*, 119, 49-59.
- WHO (World Health Organization) (1993).** Evaluation of certain food additives and contaminants, Fortyfirst Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Technical Report 837.
- Zohouri A, Tekeli SK (1999).** Ratlarda Kadmiyumun Metabolizma Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması. *Istanbul Üniv Vet Fak Derg* 25(2), 261-71.



VAN VETERINARY JOURNAL



Article Copyright Transfer Agreement Form

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

Title of the article:

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

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

Authorized Researcher

Title, Name-Surname :

Full Address :

e- mail :

Tel, Fax :

Date and Signature :



Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is **Van Vet J.**
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication. Article plagiarism report: Before submitting an article to our journal, the similarity of the article should be determined and uploaded to the system with appropriate plagiarism software programs (iThenticate, Turnitin etc.). The overall similarity rate is expected to be below 10%, but up to a 15% similarity rate is allowed by the Editorial Board, depending on the nature of the study. Articles that are over this determined rate are returned to the author..
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://dergipark.gov.tr/vanvetj> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures, graphs and references; original article should not exceed 15 pages, short paper and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 250 words. Abstract should include **Aim, Material and Methods, Results** and **Suggestion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system. In addition, if there is a requirement and necessity for "Ethics Committee Approval" in scientific studies sent to our journal, explanatory information including the name, number and date of the ethics committee from which the ethics committee approval /

permit document was obtained should be clearly stated in the material and method section.

9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.

10- **Copyright Transfer Agreement Form** should be signed by all authors and submitted electronically by uploading manuscript.

11- Apart from tables all visual elements (Graphics, photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **Figure**. Tables and graphs are named as it is.

12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish** and **English** in the text. It should be numbered according to the order of use, expressed in short titles, and should be cited by giving the table number in the text. Table titles should be written in the writing language of the article in the upper part of the table. Abbreviations used in the table and necessary explanations should be given under the table. Figure titles should be written at the bottom of the figure in the writing language of the article.

13- **Cover file** should be created and uploaded to the system. **Title Page: Turkish and English titles, author names, institutional information (English and Turkish), projects, congresses, ethics, etc. information should be provided. [Click here for Sample Title Page.](#)**

14- **Original Article:**

Main Text File: Title. Short Title. Abstract and Keywords, English title, Introduction with Abstract and Keywords, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgment or Information (if any), References. Each Table and Figure should be on separate pages.

Case Reports:

Scientific works in which the authors encounter new or rare observed cases. Maximum 15 sources should be used and attention should be paid to the possibility of current sources. Case reports; It should consist of Summary, Introduction, Case description, Discussion and Conclusion and References sections.

Short Paper:

It should be prepared in the form of a research paper and should not exceed 5 pages. It should contain no more than 2 tables and figures.

15- References should be listed according to authors surname alphabetically (APA Citation type). In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Isleyici et al. 2015). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the **Web of Science**. For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:

Articles:

Isleyici O, Sancak YC, Sancak H, Yucel UM (2015). Determination of aflatoxin M1 levels in unpackaged sold raw cow's milk. *Van Vet J*, 26 (3), 151-155.

Fleming DW, Cochi SL, MacDonald KL et al. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England J Med*, 312 (7), 404-407. (For articles with more than 6 authors)

Ekin IH, Gurturk K, Ilhan Z, Arabaci C, Gulaydin O (2015). Detection of enzyme activities and their relation to serotypes of bovine and human group B streptococci. *J Med Microbiol*, 64, 985-989

Books:

Marrow DA (1986). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Books chapters:

Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.

Electronic Material: The name of the article and available web address and access date should be written.

Anonymus

(1) http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ Access date: 10 January 2009.

Thesis:

Mis L (2009). The effect of zinc inadequate diet and the addition of zinc on lipid peroxidation and erythropoietin levels in rats with experimental renal failure. PhD thesis, Van Yüzüncü Yıl University Institute of Health Sciences, Van.

Paper Submitted at the Scientific Meeting:

Oğuz B (2018). Molecular Analysis of *Echinococcus granulosus* through Amplification of COX1 Gene Fragments from Sheep in Van province. In: Proceeding of the 1st International GAP Agriculture and Livestock Congress, Sanliurfa, Turkey.

16- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>). Up to 5, including one under the abstract should be given in both languages.

17- Article publications in this Journal is FREE.

18- Copyright fee will not be paid to the author(s).

19- Van Veterinary Journal uses double-blind review procedure, which both the reviewer and author identities are concealed from each other throughout process. Authors approve to submit their manuscript in compliance with the double-blind review policy.

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

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