



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

K o c a t e p e Veterinary Journal

2021, 14 (1), March



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

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

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

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

Editor in Chief

Assoc. Prof. Dr. Zeki GÜRLER

Editors

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

Assist. Editors

Assoc. Prof. Dr. Muhammed Enes İNANÇ
Dr. Özlem GÜCÜYENER HACAN
Dr. Eyüp Eren GÜLTEPE

Section Editors

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

Foreing Language Editor

Prof. Dr. İbrahim DEMİRKAN
Assoc. Prof. Dr. Ulaş ACARÖZ

Statistics Editors

Assoc. Prof. Dr. İbrahim KILIÇ
Assoc. Prof. Dr. İlkey DOĞAN

Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK
Dr. Barış DENK
Research Assist. Murat KIRIKKULAK

Prof. Dr. Arif Altıntaş

Prof. Dr. Atilla Şimşek

Prof. Dr. Cevdet Uğuz

Prof. Dr. Yavuz O. Birdane

Prof. Dr. İbrahim Demirkan

Prof. Dr. İlhami Çelik

Prof. Dr. İsmail Bayram

Prof. Dr. Abdullah Kaya

Prof. Dr. Mustafa Alışarlı

Prof. Dr. Nalan Baysu Sözbilir

Prof. Dr. Recep Aslan

Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu

Prof. Dr. Zafer Karaer

Prof. Dr. Zehra Bozkurt

Prof. Dr. İbrahim Taşal

Prof. Dr. Şule Kaya

Prof. Dr. Korhan Altunbaş

Prof. Dr. Aysun Demirkan

Prof. Dr. Hasan Çiçek

Prof. Dr. Fatih M. Birdane

Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak

Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz

Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç

Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt

Ankara University -Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ondokuz Mayıs University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Selçuk University-Turkey

Ankara University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Mehmet Akif Ersoy University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

Afyon Kocatepe University-Turkey

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

Kocatepe Veterinary Journal;

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

Addressed:

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

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

www.kvj.aku.edu.tr

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

Only accepts online submission

The Reviewer List (in alphabetical order)

Ali ÇALIK	Ankara University
Ali Doğan ÖMÜR	Erzurum Atatürk University
Ali Reha AĞAOĞLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Ali Tümay GÜRLER	Ondokuz Mayıs University
Ali YİĞİT	Kafkas University
Aykut ULUCAN	Bingöl University
Ayşe MENTEŞ GÜRLER	Harran University
Beytullah KENAR	Afyon Kocatepe University
Burcu MENEKŞE BALKAN	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Cihan KAÇAR	Kafkas University
Cüneyt ÇAĞLAYAN	Bingöl University
Deniz ULUIŞIK	Selcuk University
Duygu BAKİ ACAR	Afyon Kocatepe University
Duygu Neval SAYIN İPEK	Dicle University
Enver YAZAR	Selçuk University
Erhan ÖZENÇ	Afyon Kocatepe University
Fatih AVDATEK	Afyon Kocatepe University
Fulya BENZER	Munzur University
Güneş ERDOĞAN	Adnan Menderes University
Harun ÇINAR	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
İsmail BAYRAM	Afyon Kocatepe University
Korhan ALTUNBAŞ	Afyon Kocatepe University
Latif Emrah YANMAZ	Erzurum Atatürk University
M. Sinan AKTAŞ	Erzurum Atatürk University
Mehmet HALIGÜR	Çukurova University
Mehtap ALTAŞ ATIĞ	Harran University
Mukadderat GÖKMEN	Balıkesir University
Mushap KURU	Kafkas University
Mustafa CELLAT	Hatay Mustafa Kemal University
Mustafa Doğa TEMİZSOYLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Mustafa Volkan YAPRAKÇI	Afyon Kocatepe University
Nermin IŞIK	Selcuk University
Rahime YAYGINGÜL	Aydın Adnan Menderes University
Ramazan ADANIR	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Serpil KAHYA DEMİRBİLEK	Uludag University
Sinem Özlem ENGİNLER	İstanbul University-Cerrahpaşa
Şule SANAL	Ondokuz Mayıs University
Taylan AKSU	Yüzüncü Yıl University
Tuba DEMİRCİ	Ataturk University
Uğur AYDOĞDU	Balıkesir University
Umut TAŞDEMİR	Aksaray University
Yasin YAKAR	Harran University
Zafer ÖZYILDIZ	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Zülfükar Kadir SARITAŞ	Afyon Kocatepe University

RESEARCH ARTICLES

- Investigation of anti-Neospora caninum Antibodies in Goats in Mesudiye District of Ordu using ELISA (Ordu'nun Mesudiye İlçesi Keçilerinde anti- Neospora caninum Antikorlarının ELISA Testi ile Araştırılması)** 1-5
Deniz ÖZDAMAR, Bilge KARATEPE, Alparslan YILDIRIM
- Investigation of the Effect of Berberine with Arginase Activity and Oxidant-Antioxidant Parameters on Bortezomib-Induced Spleen Injury in Rats (Ratlarda Bortezomib Kaynaklı Dalak Hasarı Üzerine Berberinin Etkisinin Arginaz Aktivitesi ve Oksidan-Antioksidan Parametreler ile İncelenmesi)** 6-15
Mustafa İLERİTÜRK, Tuba DOĞAN, Özge KANDEMİR
- Protective Effects of Naringin on Lung Toxicity Induced by 5-Fluorouracil in Rats (Ratlarda 5-Fluorouracil ile İndüklenen Akciğer Toksikitesi Üzerine Naringinin Korumucu Etkileri)** 16-25
Semin GEDİKLİ, Elif ERBAŞ
- Pigeon in Konya Province Folklore: 1. Diseases and Their Treatments (Konya İli Folklorunda Güvercin: 1. Hastalıklar ve Tedavileri)** 26-36
Aşkın YAŞAR, Esra ÇELİK, Gökhan ASLIM
- Effects of Age on The Concentrations of Plasma Cytokines and Lipidperoxidation in Sheep (Koyunlarda Plazma Sitokin ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerine Yaşın Etkisi)** 37-44
Mehmet Naci SALİM, İbrahim DURMUŞ, Mehmet BAŞEĞMEZ, İsmail KÜÇÜKKURT, Abdullah ERYAVUZ
- The Effect of Intrauterine Thyme Essential Oil and Dimethyl Sulfoxide Infusion on Clinical Recovery and Serum Haptoglobin, Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Levels in Cows with Clinical Endometritis (Klinik Endometritli İneklere İntranterin Kekik Esansiyel Yağı ile Birlikte Dimetil Sülfoksit Uygulamasının Klinik İyileşme Üzerine ve Serum Haptoglobin, Tümör Nekrozis Faktör ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi)** 45-50
Semra KAYA, Cihan KAÇAR, Oğuz MERHAN, Murat Can DEMİR, Umut Çağın ARI, Abuzer Kafar ZONTURLU
- Molecular Characterization of Trichophyton Verrucosum Strains Isolated From Cattle by PCR-RFLP (Sığırlardan İzole Edilen Trichophyton Verrucosum Suşlarının PCR-RFLP ile Moleküler Karakterizasyonu)** 51-56
Osman Yaşar TEL, Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE, Oktay KESKİN, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK
- The Effects of Supplementing Different Vegetable Oils in the Diet of Quails on Growth, Carcass Traits and Serum Biochemical Parameters (Bıldırcın Rasyonlarına Katılan Farklı Yağ Kaynaklarının Büyüme, Karkas Özellikleri ve Serum Biyokimyasal Parametrelere Etkisi)** 57-64
Zeynep KARA, Tuba BÜLBÜL
- Determination of Heavy Metal Level in Grey Mullet (Mugil cephalus, Linnaeus, 1758) Fish Caught from Bafa Lake (Bafa Gölü'nden Ayrılan Topan Keçal (Mugil cephalus, Linnaeus, 1758) Türü Balıklarda Ağır Metal Düzeyinin Belirlenmesi)** 65-70
Süleyman ÖNER, Murat METLİ
- First Molecular Characterization of Hysterothylacium Fabri Larvae (Nematoda: Raphidascarididae) in the Mediterranean Sea Based on the Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequence (Akdeniz'deki Hysterothylacium Fabri (Nematoda: Raphidascarididae) Larvasının İlk Kez Küçük Alt Ünite Ribozomal RNA Gen Bölgesinin Sekansına Göre Moleküler Karakterizasyonu)** 71-76
Emrah ŞİMŞEK, Neslihan SÜRSAL, Gupse Kübra KARADEMİR, Gökmen Zafer PEKMEZCİ
- Comparison of The Plant Heights and Relative Feed Values of Triticale and Vetch Mixtures Produced by a Hydroponic System (Hidroponik Sistemde Üretilen Tritikale ve Fığ Karışımlarının Bitki Boyları ile Nispi Yem Değerlerinin Karşılaştırılması)** 77-82
Mine AKMAN, Şenol GÜZEL, Hıdır GÜMÜŞ
- The Effect of Carprofen Treatment on Conception Rate After Insemination in Cows with Increased Days in Milk (Sağamda Geçen Gün Süresi Artmış Olan İneklere Tobumlama Sonrası Karprofen Uygulamasının Gebe Kalma Oranı Üzerine Etkisi)** 83-90
Hasan ALKAN, Fatma SATILMIŞ, Ömer Faruk YEŞİLKAYA, Muhammed Furkan ÇİFTÇİ, Kübra KARAKAŞ ALKAN, Hüseyin ERDEM
- Investigations on Veterinary Folklore in the Lower Euphrates Basin: Folk Beliefs and Practices Applied on Animals (Aşağı Fırat Havzasında Veteriner Hekimliği Folkloru Üzerine Araştırmalar: Hayvanlar ile İlgili İnanışlar ve Uygulamalar)** 91-100
Erhan YÜKSEL, Raşan ÖZEN
- Incidence of Periodontal Disease and Treatment Options in Cat and Dogs (Kedi ve Köpeklerde Periodontal Hastalığın Oluşma İnsidansı ve Tedavi Seçenekleri)** 101-112
Nedime ATAGÜR SELEK, Mustafa ARICAN
- Effect of Injectable Vitamin and Trace Element Administrations During Transition Period on Fertility in Brown Swiss Dairy Cows (İsviçre Esmeri ineklerde geçiş döneminde vitamin, iz element uygulamalarının fertilitéye etkisinin araştırılması)** 113-122
Murat Onur YAZLIK, Mehmet Rifat VURAL, Şükrü KÜPLÜLÜ, Mert PEKCAN
- Investigation of Ram Sperm Acrosome Integrity in Relation with Seminal Plasma Homocysteine and Nesfatin-1 Levels (Koc Sperma Akrozom Bütünlüğünün Seminal Plazma Homosistein ve Nesfatin-1 Düzeyleri ile İlişkili Olarak İncelenmesi)** 123-128
Caner ÖZTÜRK, Şükrü GÜNGÖR, Muhammed Enes İNANÇ, Neşe Hayat AKSOY
- Cataract Evaluation in Owned Patients Admitted to the Clinic for Eye Diseases: A Retrospective Study 2018-2020 (Kliniğe Göz Hastalıkları ile Getirilen Sahipli Hastalarda Katarakt Değerlendirilmesi: Retrospektif Çalışma 2018-2020)** 129-136
Kamuran PAMUK
- Comparison of the Pathomorphological and Immunohistochemical Findings of an Experimental Co-infection with Infectious Bronchitis Virus M-41 and Bordetella Avium in Chicks (Cücvirlerde Enfeksiyöz Bronşitis Virüsü M-41 Suşu ve Bordetella Avium ile Oluşturulan Deneysel Koenfeksiyonunda Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması)** 137-148
Mehmet Fatih BOZKURT, Günay ALÇIĞIR
- Effects of Surgical Skills of Veterinary Medicine Students on Postoperative Stress, Oxidative Stress and Pain in Bitches Undergoing Ovariohysterectomy (Veteriner Hekimliği Öğrencilerinin Cerrahi Becerilerinin Ovaryobistektomi Yapılan Köpeklerde Postoperatif Stres, Oksidatif Stres ve Ağrı Üzerine Etkileri)** 149-158
Merve CAN, Oktay YILMAZ

CASE REPORTS

- Total Prostatectomy in a Dog with Perineal Hernia (Perineal Hernialı Bir Köpekte Total Prostatektomi Olgusu)** 159-165
M. İrem BAŞER, Yusuf ŞEN, Şevket ÖZVEREL, Erfaneh PİRPANAHİ, Ozan AHLAT, Fati QOTİ, Ali BUMİN, Osman KUTSAL
- Case of Fetal Maceration in a Dog (Bir Köpekte Fetal Maserasyon Olgusu)** 166-170
Ece TUNÇ, Hacı Ahmet ÇELİK
- Clinical, Ultrasonographic and Pathologic Evaluation of Cystic Mucinous Gallbladder in a Dog (Bir Köpekte Kistik Müsinöz Safra Kesesinin Klinik, Ultrasonografik ve Patolojik Değerlendirilmesi)** 171-176
Mustafa KABU, Mehmet Fatih BOZKURT, Durmuş Fatih BAŞER, C. Çağrı CINGI

Investigation of anti-Neospora caninum Antibodies in Goats in Mesudiye District of Ordu using ELISA

Deniz ÖZDAMAR¹, Bilge KARATEPE^{2*}, Alparslan YILDIRIM³

¹Niğde Ömer Halisdemir University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Biology Department, 51240, Niğde, Turkey

²Niğde Ömer Halisdemir University, Bor Vocational School, 51700, Niğde, Turkey

³Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, 38280, Kayseri, Turkey

ABSTRACT

This research was carried out to investigate the seroprevalence of *Neospora caninum* in goats of Mesudiye district in Ordu province. A total of 184 female goats, which were a year old or more, were randomly selected from five different study sites (Arpaalan, Birebir, Çiftlikarıca, Yeşilçit and Musalı) and the serum samples of the goats were analyzed for anti-*N.caninum* antibodies by applying ELISA. 16 out of 184 sera (8.69%) were determined as seropositive for anti-*N.caninum* antibodies. In terms of age groups, the seropositivity rate was highest in the 2 years old goats (13.04%), while no seropositivity was detected in 1-year-old goats. The highest seropositivity rate amongst the study sites was found in Birebir with 36.6%, whereas none of the goats were seropositive examined in Çiftlikarıca (April) and Yeşilçit. Sixteen (8.98%) out of 178 non-aborted goats were detected as seropositive, while there was no seropositivity in the 6 goats with abortion history. *Neospora caninum* seroprevalence was not found to be statistically significant with regards to the age groups of the goats and aborting or non-aborting status ($P>0.05$), on the other hand, the results showed statistically significant ($P<0.001$) with regards to the research sites. This is the first serological report on *N.caninum* in goats of Mesudiye district in Ordu province.

Key Words: *Neospora caninum*, neosporosis, goat, Ordu–Mesudiye, seroprevalence, ELISA

Ordu'nun Mesudiye İlçesi Keçilerinde anti- Neospora caninum Antikorlarının ELISA Testi ile Araştırılması

ÖZ

Bu çalışma, Ordu'nun Mesudiye ilçesi keçilerinde *Neospora caninum* seroprevalansının saptanması amacı ile yapılmıştır. Araştırmada Mesudiye ilçesindeki 5 farklı çalışma merkezine ait (Arpaalan, Birebir, Çiftlikarıca, Yeşilçit ve Musalı) 1 yaş ve üzerinde rastgele seçilen toplam 184 dişi keçinin kan serumlarında *N. caninum* antikorları ELISA testi ile incelenmiştir. Çalışma ile Ordu'nun Mesudiye ilçesinde incelenen toplam 184 dişi keçinin 16'sı (%8.69) anti-*N. caninum* antikorları yönünden seropozitif olarak saptanmıştır. Yaş grupları açısından, en fazla seropozitiflik oranı %13.04 ile iki yaşındaki keçilerde belirlenmiş, bir yaşındaki keçilerde ise seropozitiflik saptanamamıştır. Çalışma merkezleri arasında en yüksek seroprevalans %36.6 ile Birebir'de belirlenmiş, Çiftlikarıca (Nisan) ve Yeşilçit'de ise seropozitiflik saptanamamıştır. Ayrıca abort görülmeyen 178 keçinin 16'sı (%8.98) seropozitif bulunurken, abort geçmişi olan 6 keçinin hiçbirinde seropozitiflik tespit edilememiştir. *Neospora caninum* seroprevalans oranları keçilerin yaş grupları ile abort görülen ve görülmeyen keçiler arasında istatistiksel olarak önemsiz bulunmuş ($P>0.05$), çalışma merkezleri açısından ise seropozitifliğin önemli olduğu saptanmıştır ($P<0.001$). Ordu'nun Mesudiye ilçesinde keçilerde *Neospora caninum* ilk defa bu çalışma ile belirlenmiş ve %8.69 oranında seropozitiflik saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Neospora caninum*, neosporosis, keçi, Ordu–Mesudiye, seroprevalans, ELISA

To cite this article: Özdamar D. Karatepe B. Yıldırım A. Investigation of anti-Neospora caninum Antibodies in Goats in Mesudiye District of Ordu using ELISA. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):1-5

Submission: 02.06.2020 Accepted: 04.12.2020 Published Online: 21.12.2020

ORCID ID; DÖ: 0000-0001-9758-3158, BK: 0000-0001-5612-2697, AY: 0000-0001-9868-0363

*Corresponding author e-mail: bkaratepe@ohu.edu.tr

GİRİŞ

Neospora caninum'a ilk defa 1984 yılında Norveç'te yeni doğan bir köpekte rastlanmış, sinirsel bozukluk ve felç bulguları görülen vakada tespit edilen parazitin morfolojik olarak *Toxoplasma gondii*'ye benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Dubey ve ark. 1988). Parazitin son konağı köpek olup, ruminantlar, at ve kemirici hayvanlar ara konak görevi görmektedir (McAllister ve ark. 1998).

Neospora caninum'un üç enfeksiyöz dönemi takizoit, bradizoit ve ookistler parazitin naklinde rol oynar. Neosporosiste bulaşma, takizoit veya bradizoit içeren enfekte dokuların yenmesi ve sporlanmış ookistlerin oral alınması sonucu post-natal (horizontal), bunun yanında takizoitlerin gebelik sırasında enfekte anneden fetüse geçmesi sonucu transplasental olarak (vertikal) gerçekleşebildiği bildirilmiştir (Dubey 2003). Keçilerde semptomlar abort ve ölü doğumlar şeklinde kendini göstermekte ayrıca yeni doğanlarda ensefalit, doğum ağırlığında azalma, meninksler ve omurilikte yangı görülmektedir. Bunun yanında hastalığın keçi

fetüslerinde otoliz ve mumifikasyon, plasentit, diyafram, karaciğer ve akciğerlerde yangıya sebep olduğu bildirilmiştir (Dubey 2003, Bowman 2003).

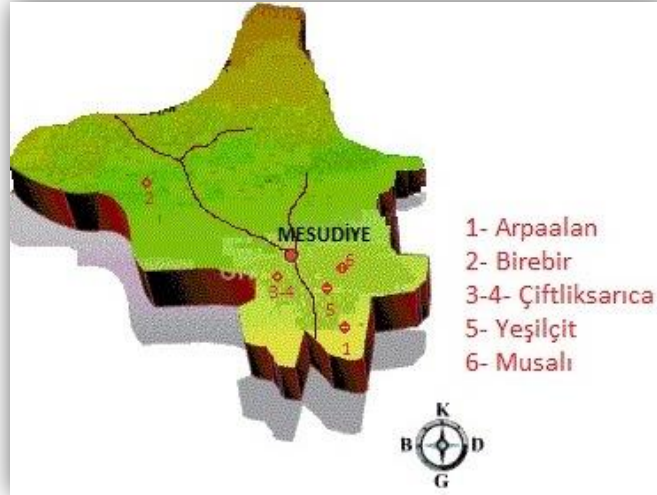
Keçilerde *N. caninum*'un prevalansı ülkemizde yapılan çalışmalarla ortaya konulmuş ve farklı prevalans oranları elde edilmiştir (Sevgili ve ark. 2003, Cayvaz ve Karatepe 2011, Utuk ve ark. 2011).

Bu çalışma ile Ordu'nun Mesudiye ilçesi keçilerinde, *N. caninum*'un oluşturduğu neosporosisin seroprevalansının belirlenmesi amaçlanmaktadır.

MATERYAL VE YÖNTEMLER

Saha Çalışmaları

Bu araştırma, Şubat-Temmuz 2014 tarihlerinde Ordu ili Mesudiye ilçesinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 1). Mesudiye ilçesinin 5 farklı çalışma merkezinde (Arpaalan, Birebir, Çiftliksarıca, Musalı, Yeşilçit) halk tarafından yetiştirilen ve rastgele seçilen 1 yaş ve üzerindeki toplam 184 dişi keçi çalışmanın materyalini oluşturmuştur.



Şekil 1: Çalışma merkezleri
Figure 1: Study centers

Çalışma merkezlerine çalışma süresince periyodik olarak her ay gidilmiş, Şubat ayında 26 keçi, Mart ayında 30 keçi, Nisan ayında 35 keçi, Mayıs ayında 30 keçi, Haziran ayında 22 keçi ve Temmuz ayında 41 keçi olmak üzere toplam 184 dişi keçinin vena jugularisinden steril vakumlu tüplere tekniğine uygun olarak kan alınmıştır. Keçilerin yaşları ve abort yapmış olma durumları belirlenerek kayıt edilmiştir.

Laboratuvar Çalışmaları

Keçilerin kan serumları laboratuvarda 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilmiş ve 1.5 ml'lik eppendorf tüpler içerisinde ELISA ile serolojik muayene yapılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Neospora caninum antikorlarının belirlenmesi amacı ile ticari kompetatif ELISA (cELISA) kiti (IDEXX, Switzerland AG Stationsstrasse 12 3097 Liebefeld-Bern, Switzerland) prosedüründe belirtildiği şekilde kullanılmıştır.

Stop solüsyonu eklendikten hemen sonra, 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında mikrotiter plate okuyucusunda (Mindray MR-96A) saptanan değerler IDEXX kit prosedüründe gösterilen formül ile hesaplanmıştır.

İstatistiksel Değerlendirmeler

Keçilerde yaş, çalışma bölgeleri ve abort durumu bakımından seropozitiflik oranlarının istatistiksel

olarak değerlendirilmesinde Ki-kare testi kullanılmıştır.

BULGULAR

16'sında (%8.69) ELISA testi ile *N. caninum* seropozitifliği belirlenmiştir.

Ordu'nun Mesudiye ilçesine bağlı 5 farklı çalışma merkezinde 1 yaş ve üzerinde toplam 184 dişi keçinin

Tablo 1. Yaş gruplarına göre keçilerde ELISA ile *N. caninum* seropozitifliği

Table 1. Seropositivity of *N. caninum* by ELISA in goats according to the age groups

Yaş Grupları	Muayene Edilen Hayvan Sayısı	Seropozitif Hayvan Sayısı	Seroprevalans (%)
1 yaş	26	0	0
2 yaş	23	3	13.04
3 yaş	72	6	8.3
4 yaş ve üstü	63	7	11.11
Toplam	184	16	8.69

(P>0.05)

Tablo 1'de belirtildiği gibi yaş grupları açısından; 2 yaşındaki 23 keçinin 3'ünde (%13.04), 3 yaşındaki 72 keçinin 6'sında (%8.33), 4 yaş ve üstü 63 keçinin 7'sinde (%11.11) seropozitiflik saptanırken 1

yaşındaki keçilerde seropozitiflik belirlenmemiştir. Keçilerde yaş bakımından *N. caninum* seropozitifliği istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

Tablo 2. Çalışma merkezlerine göre *N. caninum*'un seropozitifliği

Table 2. Seropositivity of *N. caninum* according to the study centers

Çalışma Merkezi	Aylar	Muayene Edilen Keçi Sayısı	Seropozitif Keçi Sayısı	Keçi Seroprevalans (%)
Arpaalan	Şubat	26	1	3.8
Birebir	Mart	30	11	36.6
Çiftlikarica	Nisan	35	0	0
Çiftlikarica	Mayıs	30	1	3.33
Yeşilçit	Haziran	22	0	0
Musalı	Temmuz	41	3	7.31
TOPLAM		184	16	8.69

(P<0.001)

Tablo 2'de görüldüğü üzere çalışma bölgeleri açısından *N. caninum* seropozitifliği; Arpaalan'da 26 keçiden 1'inde (%3.8), Birebir'de 30 keçiden 11'inde (%36.6), Çiftlikarica'da 30 keçiden 1'inde (%3.33) ve Musalı'da 41 keçiden 3'ünde (%7.31) saptanmış olup, Nisan ayında Çiftlikarica'dan alınan 35 keçide ve

Haziran ayında Yeşilçit'ten alınan 22 keçide *N. caninum* antikorları belirlenmemiştir. Çalışma merkezleri açısından Mesudiye yöresinde *N. caninum* varlığı istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P<0.001).

Tablo 3. Abort yapan ve yapmayan keçilerdeki seropozitiflik

Table 3. Seropositivity in aborted and non-aborted goats

Gruplar	Keçi Sayısı	Seropozitif Keçi Sayısı	%
Abort Yapan	6	0	0
Abort Yapmayan	178	16	8.98
Toplam	184	16	8.69

(P>0.05)

Tablo 3'de keçilerde abort yapma durumu açısından seropozitiflik durumu verilmiştir. Abort geçmişi olan 6 keçiden hiçbirinde seropozitiflik tespit edilemezken, abort yapmayan 178 keçinin 16'sı (%8.98) seropozitif

belirlenmiştir. Her iki grup arasında seropozitiflik düzeyi karşılaştırıldığında veriler istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (P>0.05).

TARTIŞMA

Keçilerde neosporosis, *N. caninum* tarafından meydana getirilen abort, ölü doğum ve yeni doğanlarda ensefalitle sonuçlanan önemli bir protozoer enfeksiyondur (Dubey 2003, Dubey ve ark. 2007).

Hastalığın semptomları teşhis açısından yetersiz olduğundan, neosporosisin teşhisinde ELISA, NAT, IFAT ve DAT gibi serolojik analizler ile özellikle moleküler yöntemlerden yararlanılmaktadır. Neosporosisin serolojik teşhisinde özellikle ELISA ve IFAT sıklıkla kullanılan tekniklerdir (Björkman ve Uggla 1999).

Dünyada keçilerde *N. caninum* ile ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda; *N. caninum* Sri Lanka'da 486 keçide ELISA, Western Blot ve IFAT ile %0.7 (Naguleswaran ve ark. 2004), Brezilya'nın Sao Paulo eyaletinde 394 keçide IFAT ile %6.4 (Figliuolo ve ark. 2004), Brezilya'nın kuzeydoğu bölgesinde IFAT ile %3.3 (Faria ve ark. 2007), Brezilya'nın Bahia eyaletinde IFAT ile %15 (Uzeda ve ark. 2007), Güney Ürdün'de ticari bir enzim immüno-deney kiti (Bommeli Diagnostic) ile 300 keçide %8 (Al-Majali ve ark. 2008), Polonya'da ELISA ve IFAT ile 1060 keçide %9 (Czopowicz ve ark. 2011), Kuzeydoğu Brezilya'nın Ibimirim eyaletinde IFAT ile 319 keçide %26.6 (Tembue ve ark. 2011), Romanya'da ELISA ile 512 keçide %2.3 (Iovu ve ark. 2012), İspanya'da PCR ile 26 keçi fetusunda %11.5 (Moreno ve ark. 2012), Çek Cumhuriyeti'nde ELISA ile 251 keçide %6 (Bartova ve Sedlak 2012), Yunanistan'da ELISA ile 375 keçide %6.9 (Anastasia ve ark. 2013), Doğu Slovakya'da ELISA ile 116 keçide %15.5 (Cobadiova ve ark. 2013), Romanya'da PCR ile 181 oğlakda %1.1 (Şuteu ve ark. 2013), Arjantin'de IFAT ile 25 keçide %8 (Unzaga ve ark. 2014), Brezilya'nın Santa Catarina eyaletinde IFAT ile 654 keçide %4.58 (Topazio ve ark. 2014) *N. caninum* seropozitifliği bulunmuştur. Bu çalışmada Mesudiye yöresinde keçilerde saptanan %8.69'luk prevalans oranının dünyada yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen prevalans oranlarından farklılık göstermesi, çalışmaların dünyanın değişik coğrafi bölgelerinde yapılmış olmasına, keçilerin yetiştirilme-beslenme şekline ve çalışmalarda kullanılan teşhis yöntemlerine bağlanabilir.

Türkiye'de *N. caninum* ile ilgili yapılmış birçok çalışma vardır. Bu çalışmalar özellikle sığırlar üzerinde gerçekleştirilmiş olup, ayrıca koyun, keçi, at ve köpekler üzerine yapılmış çalışmalar da bulunmaktadır. Türkiye'de keçilerde *N. caninum* ile ilgili yapılmış çalışmalarda ise; Sevgili ve ark. (2003), Şanlıurfa'da 85 kıl keçisinin 4'ünde (%4.7), 95 halep keçisinin 5'inde (%5.2), Cayvaz ve Karatepe (2011), Niğde yöresinde ELISA testi ile 181 dişi keçinin 47'sinde (%25.9), Utuk ve ark. (2011), Elazığ, Erzurum ve Kırşehir illerinde ELISA ile 87 Saanen keçisinin 12'sinde (%13.8) ve 41 Kıl keçisinin 1'inde (%2.4) seropozitiflik bulunmuştur. Yapılan bu çalışmada ise Ordu'nun Mesudiye yöresindeki 184 keçinin 16'sında (%8.69) *N. caninum* seropozitifliği

saptanmıştır. Bu çalışmada elde edilen seropozitiflik oranının Şanlıurfa yöresinde gerçekleştirilen çalışmada (Sevgili ve ark. 2003) tespit edilen sonuçlardan daha yüksek olduğu, Utuk ve ark. (2011)'nin Elazığ, Erzurum ve Kırşehir yörelerinde elde ettikleri sonuçla (%13.8) uyumluluk gösterdiği, fakat Cayvaz ve Karatepe (2011)'nin Niğde yöresinde tespit ettikleri sonuçlarla (%25.9) kıyaslandığında ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda elde edilen farklı seroprevalans oranları, araştırmanın yapıldığı yöre, keçilerin yetiştirilme şartları, keçi sayısı ve kullanılan serolojik yöntemler gibi faktörlerden kaynaklanabilir.

Bu çalışmada Ordu'nun Mesudiye yöresindeki 1 yaşındaki keçilerde seropozitiflik oranı belirlenemezken en fazla seropozitiflik oranı %13.04 ile 2 yaşındaki keçilerde saptanmıştır. Utuk ve ark. (2011) Elazığ, Erzurum ve Kırşehir yörelerinde *N. caninum* seropozitifliğini 2-4 yaş arası keçilerde saptadıklarını bildirmişlerdir. Sevgili ve ark. (2003) Şanlıurfa yöresi keçilerinde yaş grupları açısından seropozitiflik oranı arasında istatistiksel fark bulamadığını belirtmiştir. Cayvaz ve Karatepe (2011) Niğde yöresinde keçilerde yaş bakımından *N. caninum* seropozitifliğini önemli olarak bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise keçilerde yaş bakımından *N. caninum*'un seropozitifliği istatistiksel açıdan önemsiz olarak tespit edilmiştir ($P>0.05$). Bu farklılıkların nedeni çalışmaların farklı bölgelerde yapılmış olmasına ve çalışmada kullanılan keçilerin sayısı ve ırkına bağlanabilir.

Bu çalışmada Ordu'nun Mesudiye yöresindeki keçilerde çalışma bölgeleri bakımından *N. caninum* seropozitifliği istatistiki açıdan anlamlı belirlenmiş ($P<0.001$) en yüksek oran %36.6 ile Birebir köyünde saptanırken Çiftlikarıca (Nisan ayı) ve Yeşilçit köyündeki keçilerde ise *N. caninum* seropozitifliği belirlenememiştir. Bu sonuç araştırmaların gerçekleştirildiği çalışma merkezlerinde uygulanan farklı yetiştirme koşullarına ve son konak köpeklerin sayısı ile bunların keçilerin ağıl, yem ve suları ile temasındaki farklılıklarla ilişkili olabilir.

Bunun yanında bu çalışmada abort yapan ve yapmayan keçilerde *N. caninum* seropozitifliğinin varlığı karşılaştırıldığında elde edilen veriler istatistiki açıdan önemsiz olarak tespit edilmiştir ($P>0.05$). Bu sonuç Niğde yöresinde Cayvaz ve Karatepe (2011)'nin keçilerin abort yapma oranlarında buldukları istatistiksel sonuçla uyum göstermektedir.

Küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde önemli ekonomik kayıplara sebep olan neosporosisin biyolojisinde son konak köpekler önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple enfeksiyondan korunma ve kontrolde, sokak köpeklerinin sayısı sınırlandırılmalı, köpek dışkıları keçilerin çevresinden arındırılarak keçilerin otladığı mera alanlarına ve ağıllara, yem ve su kaynaklarına teması engellenmelidir. Plasental membranlar ve atık fetus kalıntıları ve çığ etlerin köpekler tarafından yenilmesine engel olunmalı ve son konak köpeklerin

keçilerin yem ve suları ile kontaminasyonu önlenmelidir.

Sonuç olarak, bu çalışma ile Mesudiye yöresindeki keçilerde *N. caninum*'un varlığı ve yaygınlığı saptanmıştır. Enfeksiyonun keçilerde abortlara ve ölü doğumlara neden olabileceği dikkate alındığında özellikle küçükbaş hayvanlarda abortların sebeplerinin araştırıldığı çalışmalarda neosporosis'in de göz önünde tutulmasının faydalı olacağı düşünülmektedir.

Proje Destek Bilgileri : Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FEB 2013/32-YÜLTEP kodu ile desteklenmiştir.

Tez Bilgileri : İlk isim yazarın Yüksek Lisans Tezi'nden özetlenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu, 09.10.2013 tarih ve 13/121 Nolu Karar

KAYNAKLAR

- Al-Majali AM, Jawasreh KI, Talafha HA, Talafha AQ. Neosporosis in Sheep and Different Breeds of Goats from Southern Jordan: Prevalence and Risk Factors Analysis. *Am J Anim Vet Sci.* 2008; 3: 47-52.
- Anastasia D, Elias P, Nikolaos P, Charilaos K, Nektarios G. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* seroprevalence in dairy sheep and goats mixed stock farming. *Vet Parasitol.* 2013; 198: 387-390.
- Bartova E, Sedlak K. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in goats in the Czech Republic. *Vet Med-Czech.* 2012; 57: 111-114.
- Björkman C, Ugglä A. Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. *Int J Parasitol.* 1999; 29: 1497-1507.
- Bowman DD, Lynn RC, Eberhard ML. *Georgis Parasitology for Veterinarians.* Elsevier Science, USA, 2003.
- Cayvaz M, Karatepe M. Niğde Yöresi Keçilerinde *Neospora caninum*'un Seroprevalansı. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011; 17: 935-939.
- Cobadiova, A., Reiterova, K., Derdakova, M., Spilovska, S., Turcekova, L., Hviscova, I. Hisira, V. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and tick-transmitted bacterium *Anaplasma phagocytophilum* infections in one selected goat farm in Slovakia. *Acta Parasitol* 2013; 58: 541-546.
- Czopowicz M, Kaba J, Szalu's-Jordanow O, Nowicki M, Witkowski L, Frymus T. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goats in Poland. *Vet Parasitol.* 2011; 178: 339-341.
- Dubey JP. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. *Korean J Parasitol.* 2003; 41: 1-16.
- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Ugglä A. Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1988; 192: 1269-1285.
- Dubey JP, Schares G, Ortega-Mora LM. Epidemiology and Control of Neosporosis and *Neospora caninum*. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20: 323-367.
- Faria EB, Gennari SM, Pena HFJ, Athayde ACR, Silva MLCR, Azevedo SS. Prevalence of anti- *Toxoplasma*

gondii and anti-*Neospora caninum* antibodies in goats slaughtered in the public slaughterhouse of Patos city, Paraíba State, Northeast region of Brazil. *Vet Parasitol.* 2007; 149:126-129.

- Figliuolo LPC, Rodrigues AAR, Viana RB, Aguiar DM, Kasai N, Gennari SM. Prevalence of anti-*Toxoplasma gondii* and anti-*Neospora caninum* antibodies in goat from São Paulo State, Brazil. *Small Ruminant Res.* 2004; 55: 29-32.
- Iovu A, Györke A, Mircean V, Gavrea R, Cozma V. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in dairy goats from Romania. *Vet Parasitol* 2012; 186: 470-474.
- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. *Int J Parasitol.* 1998; 28: 1473-1478.
- Moreno B, Collantes-Fernandez E, Villa A, Navarro A, Regidor-Cerrillo J, Ortega-Mora LM. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet Parasitol.* 2012; 187: 312-318.
- Naguleswaran A, Hemphill A, Rajapakse RPVJ, Sager H. Elaboration of a crude antigen ELISA for serodiagnosis of caprine neosporosis: validation of the test by detection of *Neospora caninum*-specific antibodies in goats from Sri Lanka. *Vet Parasitol.* 2004; 126: 257-262.
- Sevgili M, Çimtay İ, Keskin O. Şanlıurfa Yöresindeki Keçilerde *Neospora caninum* Enfeksiyonunun Seroprevalansı. *Türkiye Parazitoloj Derg.* 2003; 27: 249-251.
- Şuteu O, Paştıu A, Györke A, Avram E, Cozma V. Molecular detection of *Neospora caninum* in slaughtered goat kids from Romania. *Sci Parasitol.* 2013; 14: 43-46.
- Tembue AASM, Ramos RAN, Sousa TR, Albuquerque AR, Costa AJ, Meunier IMJ, Faustino MAG, Alves LC. Serological survey of *Neospora caninum* in small ruminants from Pernambuco State, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2011; 20: 246-248.
- Topazio JP, Weber A, Camillo G, Vogel FF, Machado G, Ribeiro A, Moura AB, Lopes LS, Tonin AA, Solda NM, Braunig P, Silva AS. Seroprevalence and risk factors for *Neospora caninum* in goats in Santa Catarina state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014; 23: 360-366.
- Unzaga JM, More G, Bacigalupe D, Rambeaud M, Pardini L, Dellarupe A, Felice LD, Gos ML, Venturini MC. *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in goat abortions from Argentina. *Parasitol Int.* 2014; 63: 865-867.
- Utuk AE, Simsek S, Piskin FC, Balkaya I. Detection of *Neospora caninum* IgG Antibodies in Goats in Elazığ, Erzurum and Kırşehir Provinces of Turkey. *Isr J Vet Med.* 2011; 66: 157-160.
- Uzeda RS, Pinheiro AM, Fernandez SY, Ayres MCC, Gondim LFP, Almeida MAO. Seroprevalence of *Neospora caninum* in dairy goats from Bahia, Brazil. *Small Ruminant Res.* 2007; 70: 257-259.

Investigation of the Effect of Berberine with Arginase Activity and Oxidant-Antioxidant Parameters on Bortezomib-Induced Spleen Injury in Rats

Mustafa İLERİTÜRK^{1*}, Tuba DOĞAN¹, Özge KANDEMİR²

¹Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 25240, Erzurum, Turkey

²Veterinary Control Institute, 25070, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effects of berberine, one of the natural flavonoids, against spleen damage caused by bortezomib (BTZ), which was widely used in the treatment of cancer. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: a control group, BTZ-treated group, berberine alone treated group 100 mg / kg, BTZ + berberine 50 mg/kg treated group, and BTZ+berberine 100 mg/kg treated group. Analysis results showed that BTZ caused oxidative stress by reducing antioxidant enzyme activities such as glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) and glutathione (GSH) levels, thereby increasing malondialdehyde (MDA) levels which is the end product of lipid peroxidation. However, by increasing the enzymatic and non-enzymatic antioxidant levels, berberine was found to reduce BTZ-induced oxidative stress and MDA levels significantly. It was also observed that BTZ decreased the total antioxidant capacity (TAC) and increased the total oxidant capacity (TOC) and nitric oxide (NO) levels, while the berberine made these parameters closer to the control group levels. Arginase activity was also measured in the study. When the results were examined, it was seen that BTZ suppressed arginase activity and BTZ and berberine combined administration regained arginase activity. Accordingly, it is thought that the berberine provides significant protection by lessening the oxidative and nitrosative stress triggered by BTZ in the spleen tissue, and after these results are supported by further studies, the berberine can be included among alternative treatment options.

Keywords: Berberine, Bortezomib, Oxidative Stress, Rat, Spleen

Ratlarda Bortezomib Kaynaklı Dalak Hasarı Üzerine Berberinin Etkisinin Arginaz Aktivitesi ve Oksidan-Antioksidan Parametreler ile İncelenmesi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı; kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bortezomib (BTZ) kaynaklı dalak hasarına karşı doğal bir flavonoid olan berberinin etkileri araştırmaktır. Bu amaçla çalışmada Sprague Dawley cinsi 35 adet erkek rat kontrol, BTZ, berberin 100 mg/kg, BTZ+berberin 50 mg/kg ve BTZ+berberin 100 mg/kg olmak üzere rastgele 5 gruba ayrıldı. Analiz sonuçları BTZ'nin glutatyon peroksidaz (GPx), süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (KAT) gibi antioksidan enzim aktivitelerini ve glutatyon (GSH) düzeylerini azaltarak oksidatif strese neden olduğunu ve böylece lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehit (MDA) seviyelerini artırdığını gösterdi. Bununla birlikte berberinin enzimatik ve non-enzimatik antioksidan düzeylerini artırması yoluyla BTZ kaynaklı oksidatif stresi hafiflettiği ve MDA seviyelerini önemli derecede azalttığı belirlendi. BTZ'nin ayrıca toplam antioksidan kapasite (TAK)'yi azalttığı, toplam oksidan kapasite (TOK) ve nitrik oksit (NO) seviyelerini ise arttığı görülürken berberinin bu parametreleri kontrol grubu seviyelerine yaklaştırdığı tespit edildi. Çalışmada ayrıca arginaz aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar incelendiğinde BTZ'nin arginaz aktivitesini baskıladığı, BTZ ile birlikte berberin uygulamasının ise dalak dokusunda arginaz aktivitesini geri kazandırdığı görüldü. Birlikte ele alındığında berberinin dalak dokusunda BTZ'nin tetiklediği oksidatif ve nitrosatif stresi hafifleterek önemli derecede koruma sağladığı ve bu sonuçların daha ileri çalışmalar ile desteklendikten sonra berberinin alternatif tedavi seçenekleri arasına girebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Berberin, Bortezomib, Dalak, Oksidatif Stres, Rat

To cite this article: İleritürk M, Doğan T, Kandemir Ö. Investigation of the Effect of Berberine with Arginase Activity and Oxidant-Antioxidant Parameters on Bortezomib-Induced Spleen Injury in Rats. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):6-15

Submission: 12.10.2020 Accepted: 18.12.2020 Published Online: 31.12.2020

ORCID ID; Mİ: 0000-0002-4581-4492, TD: 0000-0003-4039-3437, ÖK: 0000-0001-8884-4186

*Corresponding author e-mail: m.ileriturk@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Sitostatik veya anti-neoplastik ilaçlar olarak da bilinen antikanser ilaçlar, kanser tedavisinde etkili olan güçlü mekanizmalara sahiptir (Kucukler ve ark. 2020a). Bu ilaçların büyük bir kısmı, DNA fonksiyonunu ve hücre sinyalinin bozarak kanser hücrelerinin çoğalmasını engellemektedir (Yardim ve ark. 2020b). Antikanser ilaçlar sadece tümör hücrelerini değil, kemoterapi esnasında dokuları ve büyüyen hücreleri de etkilemektedir. Bu nedenle, hepatotoksisite, nefrotoksisite, nörotoksisite, testis toksisitesi, kardiyak toksisite ve dalak toksisitesi gibi istenmeyen yan etkilere neden olmaktadır (Kandemir ve ark. 2011, Liu ve ark. 2015, Kandemir ve ark. 2017a, Benzer ve ark. 2018b, Celik ve ark. 2020d, Ozdemir ve ark. 2020). Antikanser ilaçlar, dalak dokusunda retikuloendotelial sistem/mononükleer fagosit sistem tarafından temizlenmektedir ve bu nedenle dalak dokusu sıklıkla toksikasyona maruz kalmaktadır (Liu ve ark. 2015).

Bazı kimyasal türlerinin uygulanmasıyla proteazom fonksiyonunun inhibisyonu sonucunda oksidatif stres indüklenmektedir (Perez-Galan ve ark. 2006, Maharjan ve ark. 2014). Bu kimyasallar arasında kanser ilerlemesinin yavaşlatılmasında oldukça etkili sonuçları olan bortezomib (BTZ) de yer almakta ve anti-kanser ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Hu ve ark. 2019, Ye ve ark. 2019). Yetişkin multipl miyelom için onaylanmış ilk proteazom inhibitörü olan bu ilacın (Richardson ve ark. 2005) apoptotik kaskattan önce reaktif oksijen türleri (ROS) üretimini arttırarak oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir (Perez-Galan ve ark. 2006).

Arginaz (E.C. 3.5.3.1), hepatositlerin sitoplazmasında bulunan arginaz-1 ve böbrek, ince bağırsak, dalak, meme bezleri, beyin, monositler ve makrofajların mitokondrilerinde eksprese edilen arginaz-2 olmak üzere iki izoformdan oluşan ve mangan içeren bir enzimdir (Kandemir ve Özdemir 2009). Toksik amonyağı ortadan kaldırmak için üre döngüsünün son reaksiyonu (L-argininin, L-ornitine ve üreye dönüştürülmesi) arginaz tarafından katalize edilmektedir (Kandemir ve Özdemir 2008). Üre döngüsü sadece hepatositlerde bulunmasına rağmen, arginaz enzimi diğer birçok hücrede görülmektedir (Kandemir ve ark. 2013). Üre döngüsündeki işlevlerinin yanı sıra poliamin sentezi ve protein biyosentezi için gerekli prolinin üretimi gibi özel işlevlere de hizmet ettiği bildirilmiştir (Kandemir ve Özdemir 2008). Arginazın birçok metabolik işlevi olduğu, bazı hastalıklarda önemli rol oynadığı ve inflamatuvar süreçlerde arginaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Kaya ve ark. 2020).

Son yıllarda kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ilaçların doz sınırlandırılmasına yol açan toksik etkilerini hafifletmek amacıyla bitkisel kökenli

ilaç denemeleri hız kazanmıştır (Taslimi ve ark. 2019). Bunlar arasında fitokimyasallar, faydalı etkileri nedeniyle çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir (Aksu ve ark. 2017, Benzer ve ark. 2018a). Flavonoidler, antikanser ilaçların toksik etkisini önemli derecede azaltan antioksidan bileşiklerdir (Yardim ve ark. 2020a). Flavonlar, flavonoller, izoflavonlar, flavanonlar, flavanonoller ve kalkanlarla kategorize edilen flavonoidler, polifenolik bileşikler olarak bilinmektedir (Kucukler ve ark. 2020b). Berberis Vulgaris veya Coptis chinensis Franch.'deki aktif izokinolin alkaloidlerinden biri olan berberin, anti-inflamatuvar, anti-diyabetik, anti-bakteriyel, hepatoprotektif ve nöroprotektif etkiler gibi birçok farmakolojik özelliğe sahiptir (Imenshahidi ve Hosseinzadeh 2016). Bunun yanında berberin, nispeten yüksek dozlarda çok düşük toksisiteye sahip olduğu ve önemli klinik özellikleri ortaya çıkardığı için çok ilgi çekmiştir (Kumar ve ark. 2015).

Sunulan çalışmada, BTZ kaynaklı dalak hasarı üzerine berberinin etkilerinin biyokimyasal parametreler ile araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada Kullanılan İlaçlar

Bortezomib (BTZ): Çalışmada kullanılan BTZ (Borcade 3.5mg IV/SC) Koçak Farma'dan (İstanbul, Türkiye) temin edildi.

Berberin: Antioksidan olarak kullanılan berberin Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD) firmasından temin edildi.

Deneyde Kullanılan Hayvanlar

Çalışmada yaşları 8-10 haftalık olan 250-270 g ağırlığında toplam 35 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (Erzurum, Turkey) temin edildi. Uygulama öncesi 1 haftalık süre boyunca ratların ortama adaptasyonları sağlandı. Ortam şartları 24 ± 1 °C ve 45 ± 5 % nem oranına sahipti. Ayrıca ratların buldukları ortamın 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahip olması sağlandı. Ratlar ad libitum olarak verilen standart pelet yem ve musluk suyu ile beslendiler. Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay no: 2020-9/134).

Deney Uygulamaları

Ratlar, her grupta 7 hayvan olacak şekilde 5 farklı gruba ayrıldı. Doz seçiminde önceki literatürlerden yararlanıldı (Moghaddam ve ark. 2014, Xie ve ark. 2017). Deney tasarımı Tablo 1'de gösterildiği gibi bir kontrol ve dört deney grubu içermektedir;

Tablo 1. Denemenin uygulama prosedürü**Table 1.** Application procedure of the experiment

Gruplar	Uygulama süreleri, dozları ve yöntemi
Sağlıklı Kontrol	Ratlara 1., 3., 5. ve 7. günlerde periton içi serum fizyolojik verildi
Berberin	Ratlara 10 gün boyunca her gün 100 mg/ kg dozda berberin oral olarak verildi.
Bortezomib	Ratlara 1., 3., 5. ve 7. günlerde 0.2 mg/kg dozunda bortezomib periton içi verildi.
Bortezomib+Bereberin 50	Ratlara 1., 3., 5. ve 7. günlerde 0.2 mg/kg dozunda bortezomib periton içi verildi. Bunun yanında 10 gün boyunca her gün 50 mg/ kg dozda berberin oral olarak verildi.
Bortezomib+Bereberin 100	Ratlara 1., 3., 5. ve 7. günlerde 0.2 mg/kg dozunda bortezomib periton içi verildi. Bunun yanında 10 gün boyunca her gün 100 mg/ kg dozda berberin oral olarak verildi.

Son berberin uygulamasından 24 saat sonra (11.gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek dalak dokuları alındı. Dokular serum fizyolojik ile yıkanarak biyokimyasal analizler yapılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

Doku Homojenatlarının Hazırlanması

Dalak dokusundan homojenat hazırlamak için, dokular MDA, GSH ve GPx analizleri için %1,15 KCl, SOD analizi için Tris-HCl tamponu (pH 7,4) ve KAT ölçümü için Triton x-100 ile sulandırıldı. Elde edilen karışım, doku lizat cihazı (TissueLyser II, Qiagen) ile homojenize edildi. Homojenat MDA ölçümü için +4 °C ve 3000 rpm'de 15 dakika, GSH ve GPx ölçümü için +4 °C ve 11000 rpm'de 20 dakika, SOD ölçümü için +4 °C ve 7000 rpm'de 60 dakika ve KAT ölçümü için +4 °C ve 3500 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Analizler için süpernatant kullanıldı.

Dalak Dokusunda Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Lipid peroksidasyon düzeyi, Placer ve ark. (1966) tarafından geliştirilen yöntem ile MDA miktarı belirlenerek hesaplandı ve nmol/g doku olarak sunuldu. Süperoksit dismutaz aktivitesi Sun ve ark. (1988) tarafından tasarlanan yöntem ile ölçüldü. Sonuçlar U/g protein olarak verildi. Katalaz aktivitesinin ölçümü Aebi (1984) tarafından geliştirilen yöntem ile gerçekleştirildi ve sonuçlar katal/g protein olarak sunuldu. Glutasyon peroksidaz aktivitesi Lawrence ve Burk (1976) tarafından geliştirilen yöntem ile ölçüldü. Sonuçlar U/g protein olarak sunuldu. Sedlak ve Lindsay (1968) tarafından sunulan yöntem ile GSH düzeyleri ölçüldü ve sonuçlar nmol/g doku olarak verildi. Total protein analizi, sığır serum albuminini (BSA) standart olarak kullanarak Lowry ve ark. (1951) tarafından belirlenen yöntem ile gerçekleştirildi.

Dalak Dokusunda Toplam Antioksidan ve Toplam Oksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Toplam antioksidan kapasite (TAK) ölçümü için Erel (2004) tarafından ve toplam oksidan kapasite (TOK)

ölçümü için yine Erel (2005) tarafından geliştirilen ve kolorimetrik ölçüme dayanan ticari test kitleri (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanıldı.

Dalak Dokusunda Nitrik Oksit Düzeyi ve Arginaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Dalak dokusunda toplam nitrik oksit (NO) seviyesini belirlemek için NO ölçüm kiti (Enzo Life Science) kullanıldı. Doku NO ölçümü, nitratın nitrite enzimatik dönüşümü ve Griess reaksiyonunun renkli bir azo boya ürünü olan nitritin kolorimetrik tespitine dayanmaktadır.

Arginaz aktivitesi, Geyer ve Dabich (1971) tarafından açıklanan tiyosemikarbazid-diasetilmonoksim üre yöntemi modifiye edilerek spektrofotometre ile belirlendi. Arginaz aktivitesi belirleme prensibi, L-argininin arginaz tarafından hidrolizi ile elde edilen ürenin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Bir ünite arginaz aktivitesi, 37 °C'de bir µmol üre/saat oluşumunu katalize eden enzim miktarı olarak ifade edilmektedir. Sonuçlar (spesifik aktivite) U/mg protein olarak sunuldu.

İstatistiksel analiz

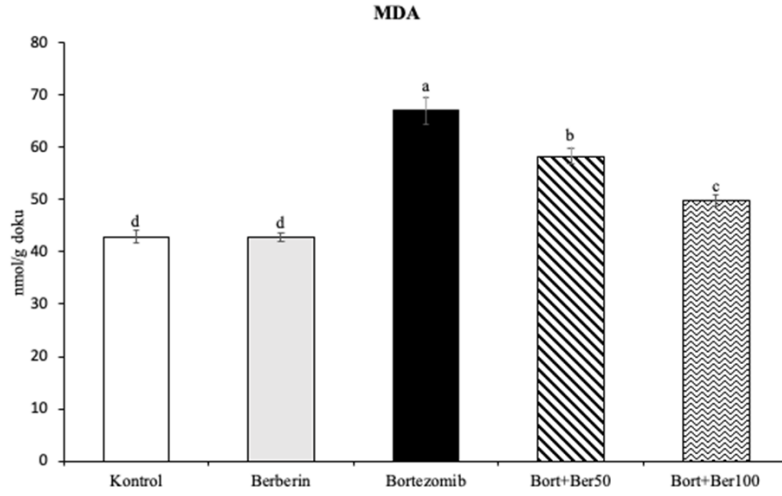
Biyokimyasal yöntemlerle elde edilen verilerin istatistiksel olarak incelenmesi, tek yönlü varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapıldı. Gruplar arasında farkın olup olmadığı Tukey's multiple comparison testi ile belirlendi. Sonuçlar ortalama ± standart hata (S.E.M) olarak verildi. P<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bortezomib ile İndüklenen Dalak Dokusunda Berberinin Lipid Peroksidasyonu Üzerine Etkisi

Dalak dokusunda BTZ'nin neden olduğu lipid peroksidasyonuna karşı berberinin etkileri Şekil 1'de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar, BTZ'nin lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA seviyelerini kontrol grubuna göre arttırdığı belirlendi (p< 0.05). Bununla birlikte BTZ kaynaklı lipid peroksidasyonunun berberin ile hafifleyerek kontrol

grubu seviyelerine yaklaştığı görüldü ($p<0.05$). Ek olarak berberinin farklı dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

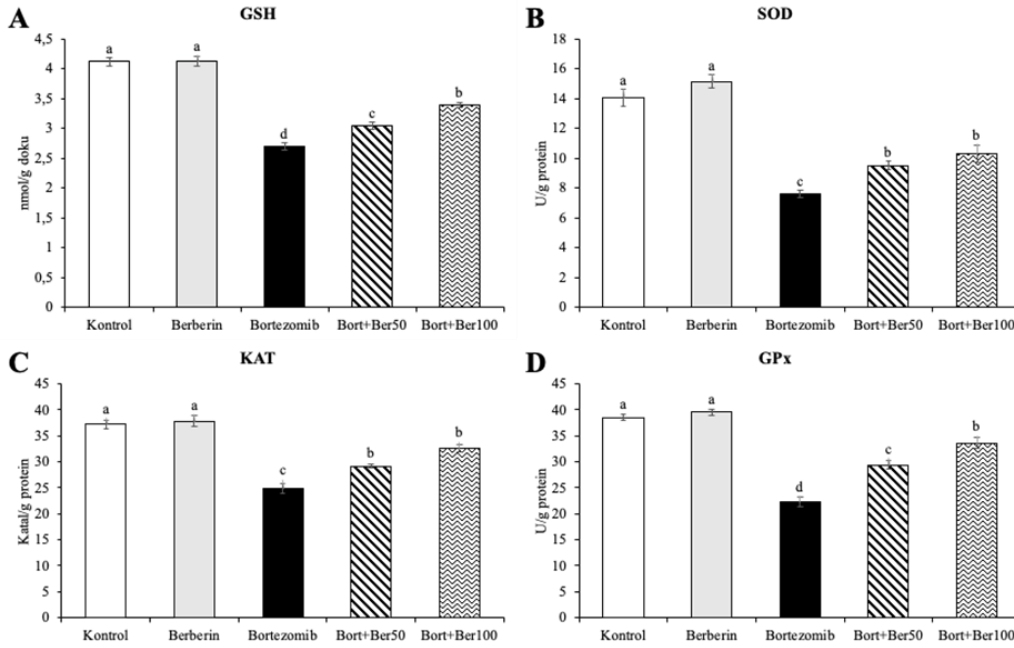


Şekil 1: Dalak dokusu MDA düzeyleri. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).
Figure 1: Spleen tissue MDA levels. Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p < 0.05$)

Bortezomib ile İndüklenen Dalak Dokusunda Berberinin Enzimatik ve Non-enzimatik Antioksidan Belirteçleri Üzerine Etkisi

Çalışmada, BTZ'nin antioksidan enzim aktivitelerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında inhibe ettiği belirlendi ($p<0.05$). Ayrıca vücuttaki önemli bir antioksidan olan GSH düzeylerinin BTZ uygulaması

ile azaldığı görüldü ($p<0.05$). Bununla beraber BTZ ile birlikte berberinin uygulaması yapılan gruplarda, BTZ grubuna göre GSH seviyelerinin arttığı ve SOD, KAT ve GPx aktivitelerinin kontrol grubu seviyelerine yaklaştığı belirlendi ($p<0.05$). Dalak dokusunda enzimatik ve non-enzimatik belirteçlere ait tüm sonuçlar Şekil 2'de sunulmuştur.



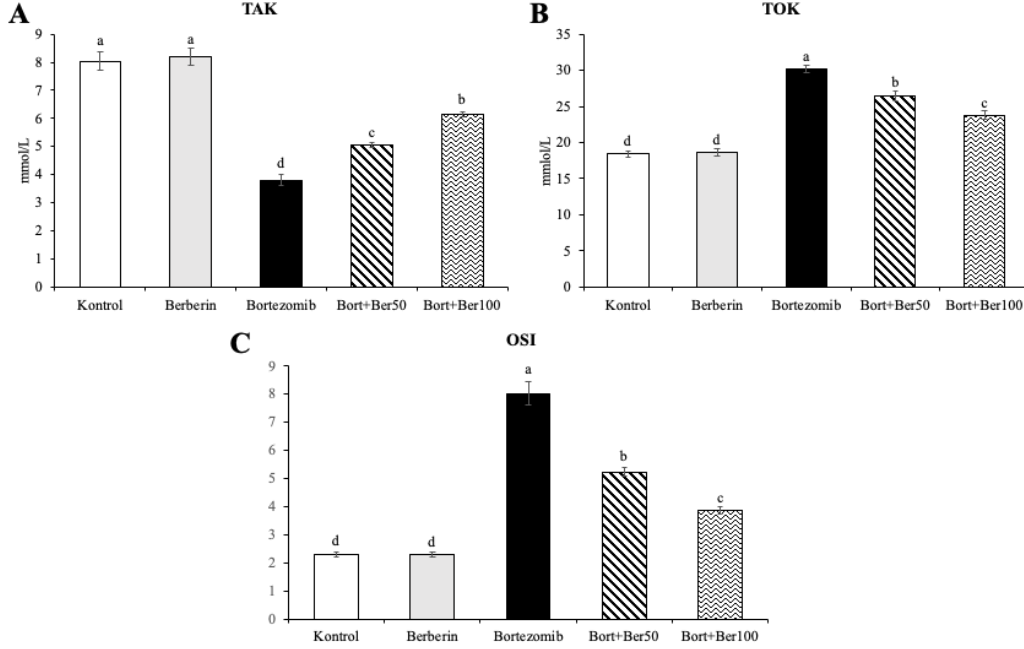
Şekil 2: Dalak dokusu GSH düzeyleri (A), SOD (B), KAT (C) ve GPx (D) aktiviteleri. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

Figure 2: Spleen tissue GSH levels (A), SOD (B) CAT (C) and GPx activities (D). Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p<0.05$).

Bortezomib ile İndüklenen Dalak Dokusunda Berberinin TAK-TOK ve OSI Üzerine Etkisi

Sunulan çalışmada, BTZ'nin TOK'u ve OSI indeksini kontrol grubuna göre arttırdığı, berberinin ise antioksidan özelliği sayesinde bu belirteçleri azalttığı tespit edildi ($p<0.05$). Ayrıca BTZ'nin dalak dokusunda antioksidan kapasiteyi düşürdüğü görüldü ($p<0.05$). Buna karşın BTZ'nin TAK'ı azalttığı,

berberinin uygulamasının ise artırdığı belirlendi ($p<0.05$). Berberinin farklı dozları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark görüldü ($p<0.05$). Dalak dokusunda TAK-TOK ile OSI'ye ait tüm sonuçlar Şekil 3'te sunulmuştur.



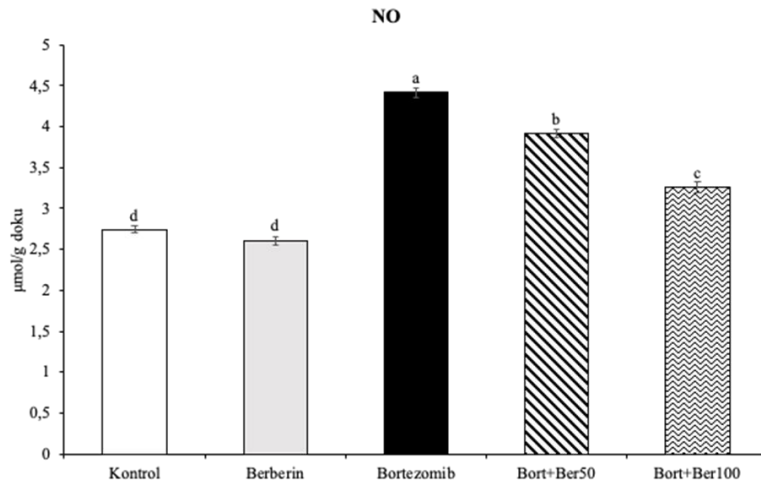
Şekil 3: Dalak dokusu TAK (A), TOK (B) ve OSI (C). Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

Figure 3: Spleen tissue TAS (A), TOS (B) and OSI (C). Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p<0.05$).

Bortezomib ile İndüklenen Dalak Dokusunda Berberinin NO Seviyesi Üzerine Etkisi

Dalak dokusunda NO seviyeleri Şekil 4'te verilmiştir. Buna göre BTZ uygulaması yapılan ratların dalak dokularında NO seviyesinin kontrol grubuna göre

oldukça yüksek olduğu belirlendi ($p<0.05$). BTZ ile birlikte berberin verilen grupların NO seviyesini sadece BTZ uygulanan gruba göre doz bağımlı olarak azalttığı görüldü ($p<0.05$).



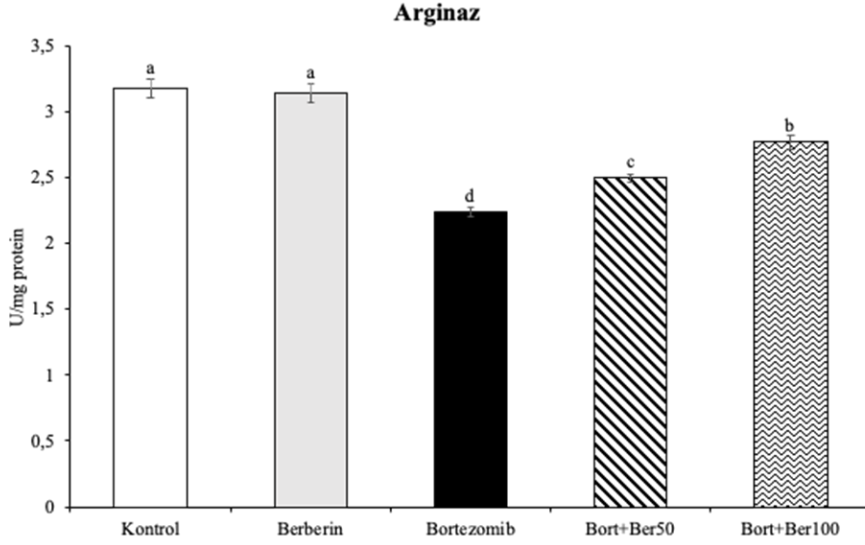
Şekil 4: Dalak dokusu NO seviyesi. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade etmektedir ($p<0.05$).

Figure 4: Spleen tissue NO level. Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p<0.05$).

Bortezomib ile İndüklenen Dalak Dokusunda Berberinin Arginaz Aktivitesi Üzerine Etkisi

Çalışmada dalak dokusu arginaz aktivitesi ölçüldü ve elde edilen sonuçlar Şekil 5'te sunuldu. Elde edilen bulgulara göre kontrol grubu ile karşılaştırıldığında BTZ'nin dalak dokusu arginaz aktivitesinde düşüşe

neden olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Berberin uygulaması ile BTZ kaynaklı arginaz aktivitesindeki düşüşün azaldığı ve kontrol seviyelerine yakın bir düzeye geldiği tespit edildi ($p < 0.05$). Berberinin 50 ve 100 mg dozları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü ($p < 0.05$).



Şekil 5: Dalak dokusu arginaz aktivitesi. Farklı harfler (a, b, c, d), gruplar arası farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$).
Figure 5: Spleen tissue arginase activity. Different letters (a, b, c, d) express the difference between the groups ($p < 0.05$).

TARTIŞMA

Kanser, gelişmekte olan ülkelerde başlıca ölüm nedenlerinden biridir ve tedavisinde sıklıkla kemoterapötik maddeler kullanılmaktadır (Celik ve ark. 2020b). Anti-kanser ajanlar üzerinde yapılan çalışmalar tümörü etkileyen mekanizmaları netleştirse de bu ilaçların toksik etkileri üzerine doz sınırlamasına neden olan yan etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca bu yan etkileri bertaraf etmek için gerekli çalışmalar da yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle sunulan çalışmada, başta multipl miyelom olmak üzere prostat, meme, akciğer, böbrek ve yumurtalık kanserleri gibi çeşitli tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan BTZ ile oluşturulan dalak toksisitesi üzerine berberinin etkileri araştırılmıştır.

Antioksidan enzimler ve bileşikler vücuttaki oksidan durumu dengelemede önemli rol oynamaktadırlar (Erişir ve ark. 2018). Hücrelerde antioksidan enzimlerin aktivitelerinde azalma ve antioksidan bileşiklerin tükenmesi sonucu oksidan maddelerin seviyelerinde artış meydana gelmekte ve bu durum oksidatif stres ile sonuçlanmaktadır (Yılmaz ve ark. 2020). Berberinin, ROS ve reaktif nitrojen türleri temizleyicisi olarak hareket ederek serbest radikallere ve dolayısıyla oksidatif strese karşı önemli bir koruyucu etkiye sahip olduğu bilinmektedir (Eftekhari ve ark. 2020). Daha önce yapılan bir çalışmada berberinin SOD, KAT ve GPx gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini ve GSH seviyesini artırdığı bildirilmiştir (Chen ve ark. 2016). Berberinin ayrıca

MDA ve NO seviyesi gibi oksidatif ve nitrosatif stres parametrelerini azalttığı da rapor edilmiştir (Adil ve ark. 2016). BTZ gibi anti-kanser ilaçlar, serbest radikal oluşumunu artırıp plazma yada doku antioksidan değerlerinde düşüşe yol açarak antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalmasına sebebiyet vermektedir (Celik ve ark. 2020c, Kandemir ve ark. 2020, Yardım ve ark. 2020c). Daha önce yapılan çalışmalarda, BTZ'nin serbest radikal oluşumunu artırarak lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve böylece oksidatif stres meydana getirdiği rapor edilmiştir (Hou ve ark. 2014, Keles ve ark. 2014, Akaras ve ark. 2017). Dalak dokusundaki membran lipidleri, oksidasyona karşı oldukça duyarlıdır (Sutradhar ve ark. 2020). Gao ve ark. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada proteaz inhibitörü uygulamasının dalak dokusunda hücre zarlarının peroksidasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada dalak dokusunda BTZ (tek doz 0,2 mg / kg i.p.) uygulaması ile lipid peroksidasyonun önemli bir belirteci olan MDA düzeyinin arttığı, berberin uygulamasında ise azaldığı tespit edildi. Sonuçlar değerlendirildiğinde, BTZ'nin lipid peroksidasyonuna neden olarak MDA seviyesinde yükselmeye sebep olduğu, berberinin ise bu hasarı azaltarak membran lipidlerinin korunmasında önemli bir rol oynadığı belirlendi.

Oksidatif strese karşı savunmada önemli bir rol oynayan enzimatik (SOD, CAT ve GPx) ve non-enzimatik (GSH) antioksidanlar, ROS'un etkilerini azaltarak veya tamamen ortadan kaldırarak hücrelere

verilen hasarı engellemektedir/önlemektedir (Buyuklu ve ark. 2015, Kandemir ve ark. 2017b). Kemoterapötiklerin serbest radikallerin üretimine neden olarak SOD, KAT ve GPx aktivitelerini ve GSH seviyelerini düşürdüğü birçok çalışma ile gösterilmiştir (Taslimi ve ark. 2019, Celik ve ark. 2020a, Kucukler ve ark. 2020a, Temel ve ark. 2020). Akaras ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada BTZ'nin serbest radikal üretiminde artışa sebep olduğu ve bunun sonucunda SOD, KAT ve GPx aktivitelerini ve GSH seviyelerini düşürdüğü için ciddi hasar oluşturduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada, BTZ uygulanan grupta azalan GSH düzeylerinin berberin gruplarında yükseldiği tespit edildi. BTZ uygulanan grupta SOD, KAT ve GPx enzim aktivitelerinin düştüğü, buna karşı berberin uygulanan gruplarda bu enzimlerin aktivitelerinin arttığı bulundu. Bu sonuçlar, berberinin dalak dokusunda BTZ tarafından meydana gelen oksidatif stresi azaltabildiğini/önleyebildiğini ve antioksidan enzim aktivitelerini ve GSH seviyelerini artırarak hücreleri olası hasarlardan koruyabildiğini göstermektedir.

Canlı organizmadaki antioksidan kapasite hakkında önemli bilgi veren TAK ve oksidan kapasitesini gösteren TOK son yıllarda sıklıkla kullanılan önemli biyokimyasal parametrelerdir. Dalak dokusunda BTZ'nin etkileri tam olarak açıklanmamış ve bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda TAK ve TOK incelenmemiştir. Daha önce yapılan çeşitli çalışmalarda enfeksiyöz ve paraziter etkenler ile iskemi-reperfüzyonun TAK seviyesini düşürüp TOK seviyesini artırdığı ve böylece organizmayı strese sürüklediği bildirilmiştir (Yildiz ve ark. 2010, Hanedan ve ark. 2015, Aktas ve ark. 2017). Kemoterapötik uygulanan ratlarda da toplam antioksidan kapasitenin düştüğü toplam oksidan kapasitesinin ise arttığı tespit edilmiştir (Al-malky ve ark. 2019, Abdelhazer ve ark. 2020, Arafa ve Atteia 2020). Sunulan çalışmada, hem 50 mg/kg hem de 100 mg/kg berberin uygulanmasının TAK'ı yükseltirken TOK'u düşürdüğü tespit edildi. Yapılan analizler sonucunda, berberinin BTZ kaynaklı dalak toksisitesine karşı antioksidan kapasiteyi artırarak koruyucu etki gösterdiği kanısına varıldı. OSI, oksidatif stresin anahtar belirteçlerinden biridir (Orciuolo ve ark. 2007). Çalışmada BTZ uygulanan grupta OSI'nin arttığı, BTZ ile berberin uygulanan gruplarda ise doza bağlı olarak azaldığı tespit edildi.

Reaktif nitrojen türleri gibi radikallerin üretimi, dalak toksisitesinin önemli bir belirteci olarak öne sürülmektedir (Kaya ve ark. 2020). Nitrosatif stres, nitrik oksit (NO) oksidatif metabolizmasına yol açmaktadır (Li ve ark. 2012). NO, endojen bir vazodilatördür (Araujo ve Welch 2006) ve çeşitli hücrel fizyolojik ve patofizyolojik durumlara aracılık eder. Aşırı miktarda NO üretimi, peroksinitrit ve nitrojen dioksit gibi reaktif nitrojen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır (Kaya ve ark. 2020). Yapılan çalışmalarda dalak toksikasyonu durumunda NO seviyelerinin arttığı tespit edilmiştir (Al-Quraishy

ve ark. 2020, Wang ve ark. 2020). Sunulan çalışmada, dalak dokusundaki NO seviyelerinde BTZ grubunda artış, berberin uygulanan gruplarda ise doza bağlı bir azalış tespit edildi. Arginaz, üre ve ornitin üretmek amacıyla aynı substrat için (L-arginin) nitrik oksit sentaz (NOS) ile rekabet etmektedir. Ornitin, doku onarımı, yara iyileşmesi ve hücrel büyüme için gerekli olan poliamin üretim yollarına dahil olmaktadır. Poliaminler NOS'u baskılamaktadır (Rath ve ark. 2014). Akomolafe ve ark. (2020) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada kemoterapötik uygulanan ratlarda toksik grubun arginaz aktivitesi kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Gerçekleştirilen başka bir çalışmada araştırmacılar oksidatif stres durumunda arginaz aktivitesinin azaldığını rapor etmişlerdir (Ali ve Zeyadi 2020). Sunulan çalışmada yalnız BTZ uygulanan ratlarda arginaz aktivitesi azalırken, BTZ ile berberinin beraber uygulandığı gruplarda artış tespit edildi. Dalak dokusunda berberin dozuna bağlı olarak artan arginaz aktivitesi L-arginin'in üre ve ornitine dönüşmesini sağlayarak NOS için L-arginin kullanılabilirliğini azaltmakta, bu da NOS'un azalan aktivitesinden dolayı NO üretiminde düşüşe neden olmaktadır. Nitrik oksit üretimindeki bu azalmadan dolayı nitrosatif stres etkinliği düşmektedir.

Sonuç olarak BTZ'nin dalak dokusunda oksidan-antioksidan dengeyi bozduğu, NO seviyesini artırıp, arginaz aktivitesini azalttığı ve buna bağlı olarak oksidatif hasara neden olduğu belirlenmiş, berberinin ise BTZ kaynaklı bu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılacak ileri düzey çalışmalar ile BTZ kaynaklı dalak hasarını azaltmada/engellemede berberinin alternatif tedavi yöntemi olarak yerini alacağı ve konuyla ilgili farklı çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri : Bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay no: 2020-9/134).

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdelhazer WY, Khalaf HM, El-Hussieny M, Bayoumi AMA, Shehata S, Refaie MMM.** Role of nitric oxide donor in methotrexate-induced testicular injury via modulation of proinflammatory mediators, eNOS and P-glycoprotein. *Hum Exp Toxicol.* 2020; 39(12): 1700-1709.
- Adil M, Kandhare AD, Dalvi G, Ghosh P, Venkata S, Raygude KS, Bodhankar SL.** Ameliorative effect of berberine against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats via attenuation of oxidative stress, inflammation, apoptosis and mitochondrial dysfunction. *Ren Fail.* 2016; 38(6): 996-1006.
- Aebi H.** Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 105 121-126.

- Akaras N, Abuc OO, Koc K, Bal T, Geyikoglu F, Atilay H, Erol HS, Yigit S, Gul M.** (1 --> 3)-beta-d-glucan enhances the toxicity induced by Bortezomib in rat testis. *J Food Biochem.* 2020; 44(3): e13155.
- Akaras N, Bal T, Atilay H, Selli J, Halici MB.** Protective effects of agomelatine on testicular damage caused by bortezomib. *Biotech Histochem.* 2017; 92(8): 552-559.
- Akomolafe SF, Olasehinde TA, Oyeleye SI, Aluko TB, Adewale OO, Ijomone OM.** Curcumin Administration Mitigates Cyclophosphamide-Induced Oxidative Damage and Restores Alteration of Enzymes Associated with Cognitive Function in Rats' Brain. *Neurotox Res.* 2020; 38: 199-210.
- Aktas MS, Kandemir FM, Kirbas A, Hanedan B, Aydın MA.** Evaluation of oxidative stress in sheep infected with *Psoroptes ovis* using total antioxidant capacity, total oxidant status, and malondialdehyde level. *J Vet Res.* 2017; 61(2): 197-201.
- Aksu EH, Kandemir FM, Özkaraca M, Ömür AD, Küçükler S, Çomaklı S.** Rutin ameliorates cisplatin-induced reproductive damage via suppression of oxidative stress and apoptosis in adult male rats. *Andrologia.* 2017; 49(1): e12593.
- Ali EMM, Zeyadi MA.** Impact of caffeic acid phenylester on nitric oxide synthase and arginase in rats intoxicated with nitrites. *J King Saud Univ Sci.* 2020; 32(4): 2454-2461.
- Al-malky H, Osman AM, Damanhoury ZA, Alkreathy HM, Al Aama JY, Ramadan WS, Al Qahtani AA, Al Mahdi HB.** Modulation of doxorubicin-induced expression of the multidrug resistance gene in breast cancer cells by diltiazem and protection against cardiotoxicity in experimental animals. *Cancer Cell Int.* 2019; 19: 191. DOI: 10.1186/s12935-019-0912-0
- Al-Quraishy S, Murshed M, Delic D, Al-Shaebi EM, Qasem MAA, Mares MM, Dkhil MA.** Plasmodium chabaudi-infected mice spleen response to synthesized silver nanoparticles from *Indigofera oblongifolia* extract. *Lett Appl Microbiol.* 2020; 71(5): 542-549.
- Arafa MH, Atteia HH.** Protective Role of Epigallocatechin Gallate in a Rat Model of Cisplatin-Induced Cerebral Inflammation and Oxidative Damage: Impact of Modulating NF- κ B and Nrf2. *Neurotox Res.* 2020; 37: 380-396.
- Araujo M, Welch WJ.** Oxidative stress and nitric oxide in kidney function. *Curr Opin Nephrol Hy.* 2006; 15(1): 72-77.
- Benzer F, Kandemir FM, Kucukler S, Comakli S, Caglayan C.** Chemoprotective effects of curcumin on doxorubicin-induced nephrotoxicity in wistar rats: by modulating inflammatory cytokines, apoptosis, oxidative stress and oxidative DNA damage. *Arch Physiol Biochem.* 2018a; 124 (5): 448-457.
- Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kucukler S, Caglayan C.** Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. *J Biochem Mol Toxic.* 2018b; 32(2): e22030.
- Buyuklu M, Kandemir FM, Ozkaraca M, Set T, Bakirci EM, Topal E, Ileriturk M, Turkmen K.** Beneficial effects of lycopene against contrast medium-induced oxidative stress, inflammation, autophagy, and apoptosis in rat kidney. *Hum Exp Toxicol.* 2015; 34(5): 487-496.
- Celik H, Kandemir FM, Caglayan C, Ozdemir S, Comakli S, Kucukler S, Yardim A.** Neuroprotective effect of rutin against colistin-induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat brain associated with the CREB/BDNF expressions. *Mol Biol Rep.* 2020a; DOI: 10.1007/s11033-020-05302-z.
- Celik H, Kucukler S, Comakli S, Caglayan C, Ozdemir S, Yardim A, Karaman M, Kandemir FM.** Neuroprotective effect of chrysin on isoniazid-induced neurotoxicity via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Neurotoxicology.* 2020b; 81: 197-208.
- Celik H, Kucukler S, Comakli S, Ozdemir S, Caglayan C, Yardim A, Kandemir FM.** Morin attenuates ifosfamide-induced neurotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, neuroinflammation and neuronal apoptosis. *Neurotoxicology.* 2020c; 76: 126-137.
- Celik H, Kucukler S, Ozdemir S, Comakli S, Gur C, Kandemir FM, Yardim A.** Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology.* 2020d; 80: 29-40.
- Chen X, Zhang Y, Zhu Z, Liu H, Guo H, Xiong C, Xie K, Zhang X, Su S.** Protective effect of berberine on doxorubicin-induced acute hepatorenal toxicity in rats. *Mol Med Rep.* 2016; 13(5): 3953-3960.
- Eftekhari A, Hasanzadeh A, Khalilov R, Hosainzadegan H, Ahmadian E, Eghbal MA.** Hepatoprotective role of berberine against paraquat-induced liver toxicity in rat. *Environ Sci Pollut Res.* 2020; DOI: 10.1007/s11356-07232-1.
- Erel O.** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004; 37(4): 277-285.
- Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38(12): 1103-1111.
- Erişir M, Benzer F, Özkaya A, Dağ Ü.** Kurşun Uygulanan Ratların Bazı Dokularında (Kalp, Akciğer, Beyin, Dalak, Kas) Oksidatif Stress Üzerine Naringenin Etkisi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg.* 2018; 13(1): 34-41.
- Gao C, Liu Y, Ma L, Wang S.** Protective effects of ulinastatin on pulmonary damage in rats following scald injury. *Burns.* 2012; 38(7): 1027-1034.
- Geyer JW, Dabich D.** Rapid Method for Determination of Arginase Activity in Tissue Homogenates. *Anal Biochem.* 1971; 39(2): 412-417.
- Hanedan B, Kirbas A, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kilic K, Benzer F.** Arginase activity and total oxidant/antioxidant capacity in cows with lung cystic echinococcosis. *Med Weter.* 2015; 71(3): 167-170.
- Hou M, Eriksson E, Svechnikov K, Jahnukainen K, Söder O, Meinhardt A, Sävendahl L.** Bortezomib treatment

causes long-term testicular dysfunction in young male mice. *Mol Cancer*. 2014; 13(1): 155-165.

- Hu B, Zhou Q, Hu YY, Zhuang L, Yi LP, Cao JX, Li TQ, Wang J.** Efficacy and Safety of Once-Weekly versus Twice-Weekly Bortezomib in Patients with Hematologic Malignancies: A Meta-analysis with Trial Sequential Analysis. *Pharmacotherapy*. 2019; 39(6): 697-708.
- Imenshahidi M, Hosseinzadeh H.** Berberis Vulgaris and Berberine: An Update Review. *Phytother Res*. 2016; 30(11): 1745-1764.
- Kandemir FM, Benzer F, Yildirim NC, Ozdemir N.** Compensatory effects of curcumin on cisplatin-induced toxicity in rabbit testis. *J Med Plants Res*. 2011; 5(3): 456-461.
- Kandemir FM, Hanedan B, Aktaş MS, Küçükler S, Çağlayan C.** Ratlarda Sıslatinden Kaynaklanan Nefrotoksisite Üzerine Rutinin İyileştirici Etkileri. *Fırat Univ Vet J Health Sci*. 2020; 34(3): 147-151.
- Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, Gur C, Batil AA, Gulcin I.** Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and anti-autophagic properties. *J Food Biochem*. 2017a; 41(5): e12398.
- Kandemir FM, Küçükler S, Çağlayan C.** Beneficial effects of silymarin and naringin against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*. 2017b; 12: 167-177.
- Kandemir, FM, Özdemir, N.** L- Lizin ve L- Ornitinin Sağır Böbrek Doku Arginaz Aktivitesi Üzerine İnhibisyon Etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağ Bil Derg*. 2008; 22(1): 1-4.
- Kandemir FM, Özdemir N.** Some Kinetic Properties of Arginase in Sheep Spleen Tissue. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2009; 15(4): 553-559.
- Kandemir FM, Yüksel M, Özdemir N, Deveci H.** A different approach to diagnosis of subclinical mastitis: milk arginase activity. *Vet Arhiv*. 2013; 83(6): 603-610.
- Kaya SO, Gur S, Erisir M, Kandemir FM, Benzer F, Kaya E, Turk G, Sonmez M.** Influence of vitamin E and vitamin E-selenium combination on arginase activity, nitric oxide level and some spermatological properties in ram semen. *Reprod Domest Anim*. 2020; 55: 162-169.
- Keles ON, Can S, Cigsar G, Colak S, Erol HS, Akaras N, Erdemci B, Bilgin BC, Can I, Unal B, Halici MB.** Hepatoprotective Effects of B-1,3-(D)-Glucan on Bortezomib-Induced Liver Damage in Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2014; 20(6): 929-938.
- Kucukler S, Darendelioglu E, Caglayan C, Ayna A, Yildirim S, Kandemir FM.** Zingerone attenuates vancomycin-induced hepatotoxicity in rats through regulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis. *Life Sci*. 2020a; 259: 118382.
- Kucukler S, Ozdemir S, Comakli S, Kandemir FM.** Effects of Chrysin Against Isoniazid-Induced Lung Injury in Rats. *Kocatepe Vet J*. 2020b; 13(2): 161-171.
- Kumar A, Ekavali Chopra K, Mukherjee M, Pottabathini R, Dhull DK.** Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update. *Eur J Pharmacol*. 2015; 761: 288-297.
- Lawrence RA, Burk RF.** Glutathione Peroxidase-Activity in Selenium-Deficient Rat-Liver. *Biochem Bioph Res Co*. 1976; 71(4): 952-958.
- Li XL, Li HL, Lu NH, Feng YC, Huang Y, Gao ZH.** Iron increases liver injury through oxidative/nitrative stress in diabetic rats: Involvement of nitrotyrosination of glucokinase. *Biochimie*. 2012; 94(12): 2620-2627.
- Liu L, Ye Q, Lu MG, Lo YC, Hsu YH, Wei MC, Chen YH, Lo SC, Wang SJ, Bain DJ, Ho C.** A New Approach to Reduce Toxicities and to Improve Bioavailabilities of Platinum-Containing Anti-Cancer Nanodrugs. *Sci Rep-Uk*. 2015; 5: 10881.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall, RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951; 193(1): 265-275.
- Maharjan S, Oku M, Tsuda M, Hoseki J, Sakai Y.** Mitochondrial impairment triggers cytosolic oxidative stress and cell death following proteasome inhibition. *Sci Rep-Uk*. 2014; 4: 5896. DOI: 10.1038/srep05896
- Moghaddam HK, Baluchnejadmojarad T, Roghani M, Khaksari M, Norouzi P, Ahoovie M, Mahboobi F.** Berberine Ameliorate Oxidative Stress and Astroglialosis in the Hippocampus of STZ-Induced Diabetic Rats. *Mol Neurobiol*. 2014; 49(2): 820-826.
- Orciuolo E, Buda G, Cecconi N, Galimberti S, Versari D, Cervetti G, Salvetti A, Petrini M.** Unexpected cardiotoxicity in haematological bortezomib treated patients. *Brit J Haematol*. 2007; 138(3): 396-397.
- Ozdemir S, Kucukler S, Comakli S, Kandemir FM.** The protective effect of Morin against ifosfamide-induced acute liver injury in rats associated with the inhibition of DNA damage and apoptosis. *Drug Chem Toxicol*. 2020; DOI: 10.1080/01480545.2020.1822390
- Perez-Galan P, Roue G, Villamor N, Montserrat E, Campo E, Colomer D.** The proteasome inhibitor bortezomib induces apoptosis in mantle-cell lymphoma through generation of ROS and Noxa activation independent of p53 status. *Blood*. 2006; 107(1): 257-264.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC.** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem*. 1966; 16(2): 359-364.
- Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M.** Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol*. 2014; 5: 532. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00532.
- Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC.** Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions, I, Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2005; 352(24): 2487-2498.

- Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25(1): 192-205.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34(3): 497-500.
- Sutradhar S, Deb A, Singh SS.** Melatonin attenuates diabetes-induced oxidative stress in spleen and suppression of splenocyte proliferation in laboratory mice. *Arch Physiol Biochem.* 2020; 1-12.
- Taslimi P, Kandemir FM, Demir Y, Ileriturk M, Temel Y, Caglayan C, Gulcin I.** The antidiabetic and anticholinergic effects of chrysin on cyclophosphamide-induced multiple organ toxicity in rats: Pharmacological evaluation of some metabolic enzyme activities. *J Biochem Mol Toxicol* 2019; 33(6): e22313.
- Temel, Y, Caglayan C, Ahmed BM, Kandemir FM, Ciftci M.** The effects of chrysin and naringin on cyclophosphamide-induced erythrocyte damage in rats: biochemical evaluation of some enzyme activities in vivo and in vitro. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 2020; DOI: 10.1007/s00210-020-01987-y
- Wang M, Xiong Y, Zhu W, Ruzel R Xu Q, Yan Z, Zhu J, Zhong M, Cheng Y, Hu S, Zhang G.** Sleeve Gastrectomy Ameliorates Diabetes-Related Spleen Damage by Improving Oxidative Stress Status in Diabetic Obese Rats. *Obes Surg.* 2020; DOI: 10.1007/s11695-020-05073-3
- Xie JD, Chen SR, Chen H, Pan HL.** Bortezomib induces neuropathic pain through protein kinase C-mediated activation of presynaptic NMDA receptors in the spinal cord. *Neuropharmacology.* 2017; 123: 477-487.
- Yardim A, Kandemir FM, Comakli S, Ozdemir S, Caglayan C, Kucukler S, Celik H.** Protective Effects of Curcumin Against Paclitaxel-Induced Spinal Cord and Sciatic Nerve Injuries in Rats. *Neurochem Res.* 2020a; DOI: 10.1007/s11064-020-03174-0
- Yardim A, Kandemir FM, Ozdemir S, Kucukler S, Comakli S, Gur C, Celik H.** Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF- κ B, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology.* 2020b; 81: 137-146.
- Yardim A, Kucukler S, Ozdemir S, Comakli S, Caglayan C, Kandemir FM, Celik H.** Silymarin alleviates docetaxel-induced central and peripheral neurotoxicity by reducing oxidative stress, inflammation and apoptosis in rats. *Gene.* 2020c; DOI: 10.1016/j.gene.2020.145239.
- Ye ZQ, Chen J, Xuan ZX, Yang WC, Chen J.** Subcutaneous bortezomib might be standard of care for patients with multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Dev Ther.* 2019; 13: 1707-1716.
- Yildiz F, Terzi A, Coban S, Bitiren M, Celik H, Aksoy N, Ozdogan MK, Cakir H.** Purified micronized flavonoid fraction ameliorates the injury of spleen and ileum secondary to hepatic ischemia-reperfusion in rats. *Dig Dis Sci.* 2010; 55(8): 2237-2243.
- Yilmaz S, Kandemir FM, Kaya E, Ozkaraca M.** Chemoprotective Effects of Propolis on Aflatoxin B1-Induced Hepatotoxicity in Rats: Oxidative Damage and

Protective Effects of Naringin on Lung Toxicity Induced by 5-Fluorouracil in Rats

Semin GEDİKLİ*, Elif ERBAŞ¹

¹ Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embryology, Erzurum, Turkey

ABSTRACT

The current study aims to investigate the protective effects of naringin, one of the natural flavonoids, against in the lungs damage caused by 5-FU, which is used chemotherapeutically. Thirty Sprague Dawley male rats weighing 200-250 g were used in the study. The rats were randomly selected and divided into the control group, the 5-FU group and the NA+5-FU group. It was observed that 5-FU caused interstitial fibrosis and congestion in the lung tissues, thickening due to inflammatory cell infiltration in the inter-alveolar septum, peribronchial lymphoid tissue hyperplasia and epithelial cell shedding in the bronchioles. It was observed that naringin application alleviated the histopathological findings in the lung and brought it closer to normal lung tissue histology. It was determined that 5-FU administration increased Bax immunopositivity in the lungs, decreased Bcl-2 immunopositivity, and naringin administration decreased Bax immunopositivity and increased Bcl-2 immunopositivity, similar to the control group. It was found that TBARS and NO levels increased significantly with 5-FU administration, GSH level decreased significantly in the lung tissues compared to the control group, and these parameters approached the levels in the control group in the naringin group. All these findings suggest that naringin administration may have beneficial effects on 5-FU-induced lung injury.

Keywords: 5-Fluorouracil, Lung, Naringin, Oxidative Stress.

Ratlarda 5-Fluorouracil ile İndüklenen Akciğer Toksisitesi Üzerine Naringinin Koruyucu Etkileri

ÖZ

Mevcut çalışmanın amacı; kemoterapötik olarak kullanılan 5-FU'nun akciğerlerde oluşturduğu hasara karşı doğal flavonoidlerden olan naringinin koruyucu etkilerini araştırmaktır. Çalışmada 200-250 g ağırlığında, 30 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek Kontrol grubu, 5-FU grubu ve NA+5-FU grubu olarak ayrıldı. 5-Fluorouracilin akciğer dokularında interstisyel fibrozis ve konjesyona, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmelerine neden olduğu gözlemlendi. Naringin uygulamasının ise akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve normal akciğer doku histolojisine yaklaştırdığı gözlemlendi. 5-Fluorouracil uygulamasının akciğerlerdeki Bax immünpozitifliğini artırırken, Bcl-2 immünpozitifliğini azalttığı, naringin uygulamasının ise kontrol grubuna benzer şekilde Bax immünpozitifliğini azaltıp, Bcl-2 immünpozitifliğini artırdığı belirlendi. Akciğer dokularında kontrole kıyasla TBARS ve NO düzeylerinin 5-FU uygulaması ile anlamlı şekilde arttığı, GSH düzeyinin ise anlamlı şekilde azaldığı, naringin uygulanan grupta ise bu parametrelerin kontrol grubundaki düzeylere yaklaştığı tespit edildi. Tüm bu bulgular naringin uygulamasının, 5-FU kaynaklı akciğer hasarında faydalı etkiler gösterebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: 5-Fluorouracil, Akciğer, Naringin, Oksidatif Stres.

To cite this article: Gedikli S, Erbaş E. Protective Effects of Naringin on Lung Toxicity Induced by 5-Fluorouracil in Rats. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):16-25

Submission: 18.08.2020 Accepted: 04.12.2020 Published Online: 22.01.2021

ORCID ID; SG: 0000-0001-8238-7226, EE: 0000-0003-1750-3889

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

GİRİŞ

Kemoterapotikler, kanser tedavisinde gerek kombine gerekse tek olarak kullanılan ilaçlardır (El-Sayyad ve ark. 2009). 5-Fluorouracil (5-FU), pirimidin analogu antimetabolitler içinde yer almaktadır. Timidilat sentaz enzimini inhibe ederek DNA sentezinde azalmaya sebep olan aynı zamanda da RNA işleme ve protein sentezine de etki eden sitotoksik bir ajandır (Sobrero ve ark. 1997). 5-FU'nun meme kanseri, kolorektal kanser, pankreas kanseri, mide, baş, boyun karsinomlarının sağaltımında (Alvarez-Cabellos ve ark. 2007) ayrıca topikal olarak bazal hücreli karsinom ve aktinik keratozların tedavisinde (Love ve ark. 2009) ve oftalmik cerrahilerde (Wong ve ark. 1991) kullanılan terapötik bir ilaç olduğu bilinmektedir.

5-Fluorouracil, sitotoksik etkisini reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesiyle sonuçlanan apoptoz ve nekroz olayları ile gösterir (Lamberti ve ark. 2012). Aynı zamanda antioksidan savunma mekanizmalarında azalmaya sebep olmak suretiyle hücrel hasara neden olmaktadır. Oksidatif stres mekanizması kemoterapi ve radyoterapide kullanılan önemli bir mekanizmadır (Juraneck ve Bezek 2005). 5-Fluorouracil metabolizması başlıca karaciğerde gerçekleşir ve sonuçta α -floro- β -alanin, karbondioksit, üre gibi bozunma ürünleri meydana gelir (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014).

5-Fluorouracil uygulaması sonucunda metabolizmada hemolitik anemi, trombositopeni, lökopeni, stomatit, mukozit ve ishal gibi bazı olumsuz etkiler meydana gelir (Stein ve ark. 2010). 5-Fluorouracil uygulamalarının neden olduğu hepatotoksisite (Abdel-Hamid ve ark. 2011) kardiyotoksisite (Lamberti ve ark. 2012) ve nörotoksisite (Han ve ark. 2008) ile ilgili olarak çok sayıda çalışma mevcuttur. Ancak tek başına uygulanan 5-FU tedavisinin akciğer üzerindeki etkilerini ortaya koymak adına yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014).

Antikanser ilaçların organ ve dokular üzerindeki yan etkilerine engel olmak amacıyla doğal etken maddeler üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Şengül ve ark. 2017, Choi ve ark. 2011, Rašković ve ark. 2011, Matouk ve ark. 2013). Bu amaçla kullanılan doğal antioksidanlardan olan flavonoidler, meyve ve sebzelerde doğal olarak bulunan kimyasallardır (Montanari ve ark. 1997). Flavonoidler, insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri bulunan, bitkisel kökenli düşük molekül ağırlıklı doğal maddeler olarak tanımlanmışlardır (Sghaier ve ark. 2011, So ve ark. 1997). Bu doğal kimyasalların alınımının kanser gibi önemli hastalıkların gelişimini engellediği bilinmektedir (Serafini ve ark. 2006). Aynı zamanda antiviral, antimikrobiyal, antineoplastik, anti-inflamatuar, antiülserojenik, sitotoksik, mutajenik, antioksidan özelliklerinin de varlığı bildirilmiştir (Formica ve Regelson 1995). Hücrelerdeki antioksidan enzimleri aktive ederek veya hidrojen atomlarının transferi mekanizmasıyla reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaksiyona giren flavonoidler

hastalıklara karşı koruyucu özellik gösterirler (Oršolić ve ark. 2011, Leopoldini ve ark. 2011).

Naringin, üzümde ve birçok turuncgillerde bulunan önemli ve aktif bir flavonoiddir ve dolayısıyla güçlü bir antioksidan ve serbest radikal süpürücü özelliğe sahip bir bileşiktir (Jung ve ark. 1983, Turgut ve ark. 2016). Naringin, lipofilik özellikte olduğu için hücre zarına kolayca bağlanarak serbest radikallerin oluşumunu en aza indirger ve bu sayede hücre zarını korur (Renugadevi ve Prabu 2009). Ayrıca toksikasyon çalışmalarında da naringinin koruyucu özellikler gösterdiği bilinmektedir (Chtourou ve ark. 2015, Lee ve ark. 2004, Hermenean ve ark. 2014, Singh ve ark. 2004). Kanser tedavisinde verilen ilaçların yanı sıra bitkisel kökenli terapötik moleküllerin de akciğer dahil çeşitli kanser türlerinde antikanser potansiyele sahip olduğu bilinmektedir. Bu moleküller arasında anjiyogenez ve tümör nekroz faktörünün inhibisyonu dahil olmak üzere farklı yollardan akciğer kanseri üzerine etki ettiği bilinen naringin de bulunmaktadır (Said-Elbahr ve ark. 2016). Naringinin hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda başka dokular üzerine (Adil ve ark. 2015, Kwatra ve ark. 2016) olan anti-inflamatuar özellikleri her ne kadar gösterilmiş olsa da akciğer hasarı üzerine olan etkisini araştıran çalışmalar sınırlıdır (Turgut ve ark. 2016). Bu nedenle yapmış olduğumuz bu çalışmada, sıçanlara intraperitoneal olarak uygulanan 5-Fluorouracilin akciğer üzerine toksik etkilerini ve bu toksik etkilere karşı naringinin koruyucu etkilerini histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal düzeylerde araştırmayı amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Kullanılan Deneysel Hayvanları ve Deneysel Prosedürü

Çalışmamızda Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 200-250 g olan, 30 adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Ratlara 14 günlük deney süresince 12 saat karanlık/aydınlık uygulandı ve hayvanlar sıcaklığı $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ olarak ayarlanmış olan odalarda, ad-libitum olarak yem ve taze su bulunan kafeslerde barındırıldı. Ratlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Gruplar aşağıda belirtildiği gibi oluşturuldu (Gelen ve ark. 2018):

1. grup Kontrol grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün boyunca intragastrik (i.g.) gavaj yoluyla 1 ml serum fizyolojik verildi.
2. grup 5-Fluorouracil (5-FU) grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün boyunca 1 ml serum fizyolojik i.g. olarak verildi. Dokuzuncu günden itibaren ise deneklere 5 gün boyunca 20 mg/kg dozunda 5-FU intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı.
3. grup Naringin+5-Fluorouracil (NA+5-FU) grubu (10 rat): Bu gruptaki ratlara 14 gün süreyle intragastrik gavaj yoluyla 100 mg/kg dozunda naringin verildi ve 9. günden itibaren 5 gün boyunca da 20 mg/kg

dozunda 5-FU ip. olarak uygulandı (Fouad ve ark. 2016).

DeneySEL uygulamaların sonunda 15. gün ratlar intramüsküler olarak 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) ve 5 mg/kg ksilazin hidroklorid (RompuN, Bayer, Türkiye) anestezi eşliğinde servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildiler. Ardından tüm sıçanların akciğer dokuları alındı ve dokuların bir kısmı histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için hemen %10'luk formaldehit solüsyonu içine konuldu. Dokuların geriye kalan kısmı ise serum fizyolojik ve deiyonize suyla yıkanıp derhal sıvı azota alındı ve biyokimyasal çalışmaların yapılması amacıyla -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edildiler.

Histopatolojik Analizler

Alınan akciğer dokuları histopatolojik değerlendirmeler için 48 saatlik süreyle %10'luk formaldehit çözeltisi içinde tespit işlemine tabi tutuldu. Ardından akan su altında yıkamaya alınan dokular, dereceli alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan, Leica RM2125RT mikrotomu (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Histopatolojik incelemeler için hazırlanan preparatlar üçlü boyama (Crosman'ın Modifiye Ettiği Mallory'nin Üçlü Boyaması) yöntemi ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi (Nikon Eclipse i50, Tokyo, Japan) ve fotoğrafları çekildi.

İmmünohistokimyasal Analizler

İmmünohistokimyasal incelemeler için streptavidin-biotin kompleks metoduna göre uygulamalar yapıldı. Bu amaçla pozitif şarjlı lamlara, 5 µm kalınlığında alınan kesitler ksilol ve alkol serilerinden geçirildi ve distile su ile yıkandı. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika tutuldu. Daha sonra dokular 2 defa 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Ardından dokular antijen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda (pH:6) mikrodalga fırında (500W) 3x5 dakika kaynatıldı. İki kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine protein bloklama solüsyonu eklendi ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. Protein blok solüsyonu kesitlerden uzaklaştırıldıktan sonra PBS ile yıkanan dokular, antikör dilüsyon buffer ile sulandırılan anti-Bax (katalog no.sc-7480, dilution 1/100; Santa Cruz, USA) ve anti-Bcl2 (katalog no.sc-7382, dilution 1/100; Santa Cruz, USA) antikörleri ile 37 °C'de 1 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda 2x5 dk. PBS ile yıkanan dokularda sekonder kit olarak Expose Mouse and Rabbit Specific HRP/DAP Detection IHC Kit (Abcam, Katalog no. ab80436) kullanıldı. Kromojen olarak 3,3-diaminobenzidine (DAB) ile muamele edilen kesitler, önce çeşme suyu ile yıkandı, ardından Mayer's hematoksilen ile 45 saniye süreyle boyama işlemi gerçekleştirildi. Alkol ve ksilol serileri sonrasında kesitler lamel ile kapatılarak ışık

mikroskobu ile incelendi (Nikon Eclipse i50, Tokyo, Japan) ve fotoğrafları çekildi. İmmünohistokimyasal boyanmanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. İmmün boyanmanın yaygınlığı 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı. İmmünohistokimyasal boyanma yaygınlığının derecesi 0 (yok), +1 (az), +2 (orta), +3 (şiddetli) olarak değerlendirildi (Küçükler ve ark. 2020).

Biyokimyasal Analizler

Deney sonunda alınan akciğer dokuları TissueLyzer II® (Qiagen, Germantown, USA) ile homojenize edildi. 10.000 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edilen homojenatlardan, süpernatantlar elde edildi. Oksidan ve antioksidan parametreler olan Glutatyon (GSH), Nitrik oksit (NO) ve Tiyobarbitürik asit reaktif substans (TBARS) seviyeleri spektrofotometrik yöntem aracılığıyla belirlendi.

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS 22.00 istatistik programı kullanılarak gerçekleştirildi. Verilerin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro-Wilk testi ile incelendi ve verilerin tanımlayıcı istatistikleri, normal dağılım gösteren değişkenler için ortalama±SD olarak belirtildi. Biyokimyasal verilerin karşılaştırılması için One-way ANOVA-Tukey testi kullanıldı. İmmunhistokimyasal verilerin analizi için de Kruskal Wallis testi kullanıldı. Gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu, ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapıldı. p<0,05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Histopatolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait akciğer kesitlerinin histopatolojik incelemesinde, hafif alveolar hipereminin dışında bronş, bronşiyol ve pulmoner interstisyum yapılarının normal görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 1A). 5-Fluorouracil uygulanan gruba ait akciğer kesitlerinde ise interstisyel fibrozis ve konjesyon, alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmeleri gözlemlendi (Şekil 1B). NA+5-FU grubuna ait akciğer kesitlerinde ise naringin uygulamasının akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve görüntünün kontrol grubundaki görüntüye yakın bir halde olduğu görüldü (Şekil 1C).

İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmunhistokimyasal boyamada Bax ve Bcl-2 antikörleri ile reaktivite gösteren pozitif hücreler kahverengi olarak gözlenmektedir. Kontrol grubuna ait ratların akciğer kesitlerinde Bax immünopozitifliğine rastlanmazken, 5-FU grubuna ait kesitlerde alveollerde ve interstisyel alanlarda yoğun Bax immünopozitifliği tespit edildi. NA+5-FU grubunda

ise naringin uygulaması ile kontrole yakın Bax immünpozitifliğinin olduğu tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 1, Şekil 2). Anti-apoptotik proteinler ailesinden olan Bcl-2 immünpozitifliği bakımından kesitler değerlendirildiğinde ise kontrol grubunda alveollerde ve interstisyel alanlardaki yoğun pozitifliğin 5-FU grubuna kıyasla önemli ölçüde fazla olduğu, naringin uygulanan gruptaki immünpozitifliğin ise 5-FU grubuna kıyasla fazla, kontrol grubuna kıyasla da az olduğu tespit edildi ($p<0,05$, Tablo 1, Şekil 2).

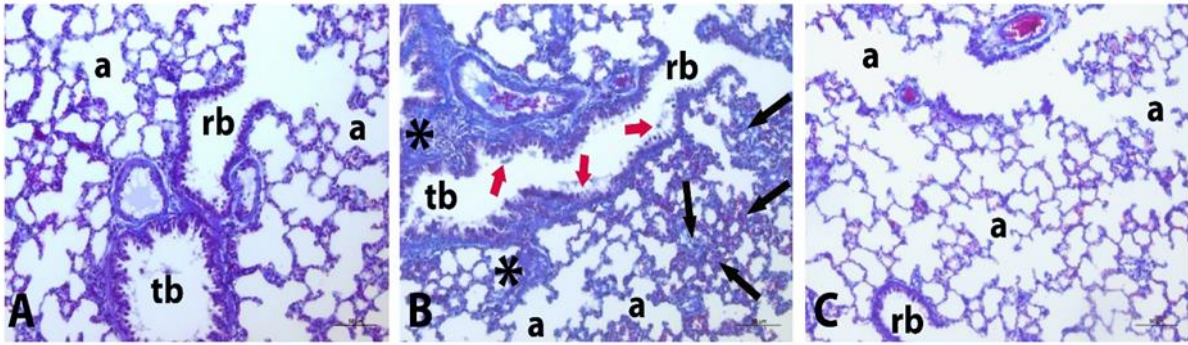
Biyokimyasal Bulgular

5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer dokusundaki GSH seviyesinin kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü ($p<0,0001$), naringin uygulanan grupta ise sadece 5-

FU verilen gruba kıyasla anlamlı şekilde arttığı ($p<0,0001$) tespit edildi (Şekil 3).

5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer dokularındaki NO seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde arttığı ($p<0,001$), naringin ile birlikte 5-FU uygulanan sıçanlarda ise istatistiksel açıdan önemli derecede azalmanın ($p<0,001$) olduğu tespit edildi (Şekil 4).

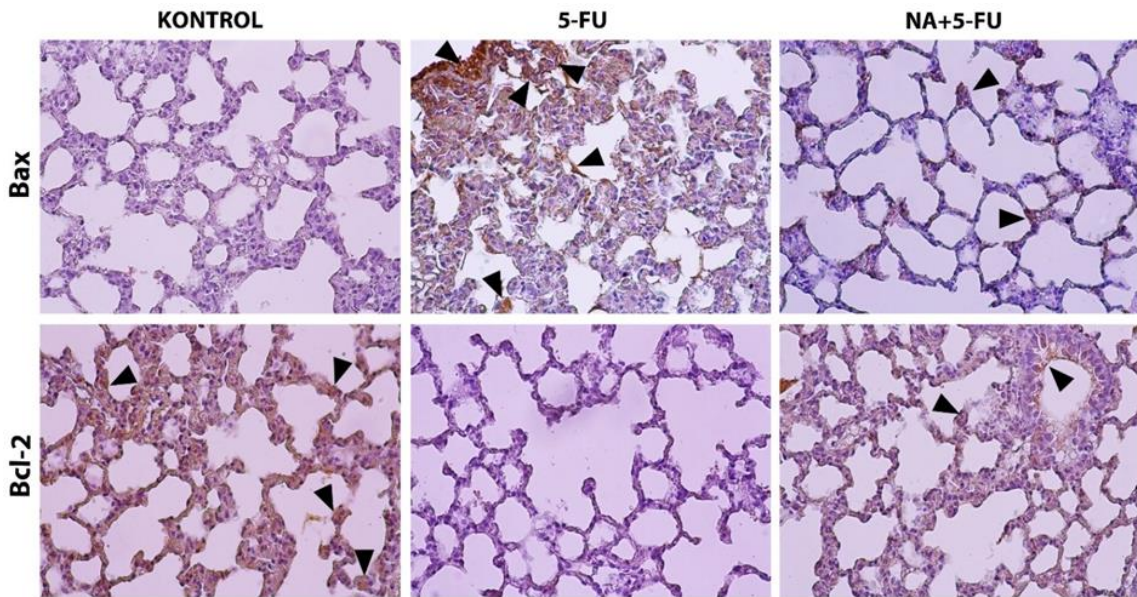
5-Fluorouracil uygulanan ratlara ait akciğer doku örneklerindeki TBARS seviyesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir şekilde arttığı ($p<0,0001$), naringin ile birlikte 5-FU uygulanan sıçanlarda ise önemli derecede azalma ($p<0,0001$) olduğu tespit edildi (Şekil 5).



Şekil 1: Kontrol (A), 5-FU (B) ve NA+5-FU (C) gruplarına ait akciğer dokularının ışık mikroskopik görüntüsü.

a: alveol, tb: terminal bronşiyol, rb: respiratuar bronşiyol, yıldız: peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ve alveoller arası septumda yangısal hücre infiltrasyonuna bağlı kalınlaşma, siyah ok: interstisyel fibrozis ve konjesyon, kırmızı ok: epitelyal hücre dökülmeleri. Boya: Crossman'ın Üçlü Boyaması. X200.

Figure 1: Light microscopic image of lung tissues belonging to Control (a), 5-FU (B) and NA+5-FU (C) groups. a: alveolus, tb: terminal bronchioles, rb: respiratory bronchioles, star: hyperplasia in the peribronchiolar lymphoid tissue and thickening due to inflammatory cell infiltration in the septum between the alveoli, black arrow: interstitial fibrosis and congestion, red arrow: exfoliated epithelial cells. Stain: Crossman's Triple Stain. X200.



Şekil 2: Kontrol, 5-FU ve NA+5-FU gruplarındaki sıçanlara ait akciğer dokusunda Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu gösteren immunohistokimyasal boyama. Ok başı: İmmünpozitif hücreler. Boya: Streptavidin-Biotin Kompleks. X200.

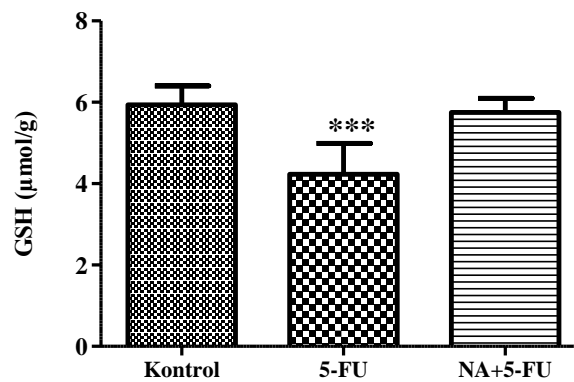
Figure 2: Immunohistochemical staining showing Bax and Bcl-2 expression in lung tissue belonging to rats in the Control, 5-FU and NA+5-FU groups. Arrowhead: Immunopositive cells. Stain: Streptavidin-Biotin Complex. X200.

Tablo 1. Akciğerlerde anti-Bax ve anti-Bcl-2 antikollarına ait immünopozitiflik skorları.

Table 1. Immunopositivity scores of anti-Bax and anti-Bcl-2 antibodies in the lungs.

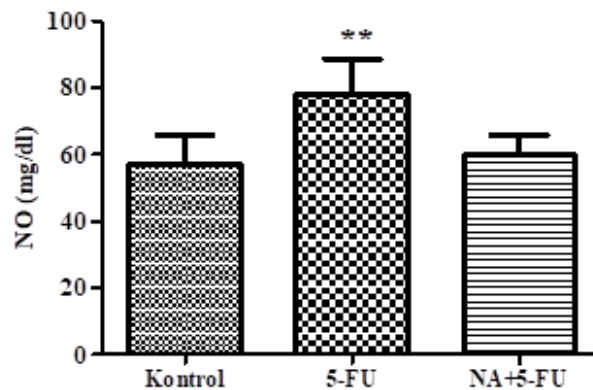
Gruplar	Anti-Bax	Anti-Bcl-2
Kontrol	0,81±0,09 ^a	2,58±0,31 ^a
5-FU	2,71±0,22 ^b	0,56±0,13 ^b
NA+5-FU	1,29±0,06 ^c	2,01±0,19 ^c

Sonuçlar ortalama±SD olarak ifade edilmiştir. ^{abc}Aynı sütundaki farklı harfler istatistik farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).



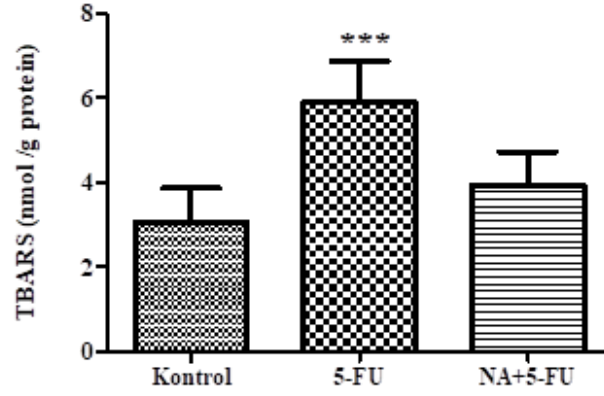
Şekil 3: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait GSH seviyelerini gösteren grafik. (***:p<0,0001, n=10. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 3: For all groups, illustration of levels of GSH in the lung tissues. (***:p<0,0001, n=10, the results were expressed as mean±SD. Error bars indicate standard deviation.)



Şekil 4: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait NO seviyelerini gösteren grafik. (**:p<0,001, n=10. Sonuçlar ortalama ± SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 4: For all groups, illustration of levels of NO in the lung tissues. (**:p<0,001, n=10, the results were expressed as mean±SD. Error bars indicate standard deviation.)



Şekil 5: Bütün gruplardaki ratların akciğer dokularına ait TBARS seviyelerini gösteren grafik. (***: $p < 0,0001$, $n = 10$. Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir. Hata çubukları standart sapmayı göstermektedir.)

Figure 5: For all groups, illustration of levels of TBARS in the lung tissues. (***: $p < 0,0001$, $n = 10$, the results were expressed as mean \pm SD. Error bars indicate standard deviation.)

TARTIŞMA

Kemoterapi kanser hastaları için başlıca tedavi yolu olsa da çok ciddi yan etkilere sebep olması nedeniyle terapötik amaçla kullanımı sınırlıdır (Ramadori ve Cameron 2010, Naidu ve ark. 2004). Şiddetli organ toksisiteleri tedavinin etkinliğini bozarak sağ kalımı olumsuz etkileyebilmektedir (Eren ve ark. 2018). Önemli bir kemoterapötik ajan olan 5-FU'nun da toksik etkileri kullanımını sınırlandırmaktadır (Gawish ve ark. 2013). 5-Fluorouracilin toksik etkilerine karşı koruyucu özellikte olabilecek doğal maddeler ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Ali 2012, Gelen ve ark. 2017, Famurewa ve ark. 2019). Yaptığımız literatür taraması ile 5-FU kullanımının hepatotoksositeye (Abdel-Hamid ve ark. 2011), kardiyotoksositeye ve nörotoksositeye (Lamberti ve ark. 2012, Han ve ark. 2008) yol açtığını gösteren çalışmalar olduğunu gördük. Ancak 5-FU'nun akciğer dokusunun histolojisi üzerinde ne gibi etkileri olduğunu gösteren sınırlı sayıda bilgiye ulaşabildik. Biz de bu amaçla 5-FU uygulaması ile akciğer toksisitesi oluşturmayı ve naringinin bu durum üzerindeki koruyucu etkilerini gözlemleyebilmeyi hedefledik.

Akciğer kesitlerinin histopatolojik incelemesinde 5-FU uygulanan grupta interstisyel fibrozis ve konjesyon, alveoller arası dokuda hücresel infiltrasyona bağlı artış, peribronşiyal lenfoid doku hiperplazisi ile birlikte bronşiyollerde epitelyal hücre dökülmeleri gözlemledik. 5-Fluorouracilin akciğer dokusunda neden olduğu yapısal değişiklikler arasında amfizem olgusunun geliştiğini, mononükleer hücre infiltrasyonu ve interstisyel fibrozisin meydana geldiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014a, Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014b). Farklı bir çalışmada 5-FU verilen farelere ait akciğerlerde konjesyon, kanama ve mononükleer hücre infiltrasyonu nedeniyle interalveolar septada kalınlaşma olduğu gösterilmiştir (Al-Jawaly ve Al-Sadi

2017). 5-Fluorouracil grubunda gözlemlediğimiz terminal bronşiyollerin etrafındaki inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bronşların etrafındaki bağ dokusu artışı bleomisin gibi başka kanser ilaçlarıyla yapılan çalışmalarda da görülmüştür (Grande ve ark. 1998, Hay ve ark. 1991). Bu durum verilen ilaç nedeniyle dokuda bozulmaların başladığını ve dolayısıyla ortamdaki inflamatuvar hücre infiltrasyonunun artışı açıklamaktadır. Akciğer fibrozisinin patofizyolojisinde ve patogenezinde rol oynayan ana nedenlerin başında reaktif oksijen türevleri gelmektedir (Dani ve ark. 2004, Bhandari ve Bhandari 2007). Fibroblastların, ekstrasellüler matriks ve kollajen lif sentezinden ve salgılanmasından sorumlu olduğu da bilinmektedir (Gien ve Kinsella 2011). Görüşümüze göre, 5-FU tarafından indüklenen ROS, fibroblastların aktivitesinde artışa; dolayısıyla da interstisyel boşluklarda daha sonra fibröz dokuya dönüşecek olan kollajen lif ve ekstrasellüler matriks artışına yol açmış olabilir.

Naringin+5-Fluorouracil grubuna ait akciğer kesitlerinde ise naringin uygulamasının akciğerdeki histopatolojik bulguları hafiflettiği ve görüntünün kontrol grubundaki görüntüye yakın bir hale geldiği görüldü. Turgut ve ark.'nın ratlarda bleomisin kaynaklı akciğer hasarına karşı naringinin koruyucu etkilerini araştırdıkları doza bağımlı bir çalışmada, naringin uygulaması ile akciğer dokusunda inflamasyon bulgularının azaldığını göstermişlerdir (Turgut ve ark. 2016). Chen ve arkadaşlarının farelerde paraquat kaynaklı akut akciğer hasarı üzerine yapmış oldukları çalışmada da naringin uygulamasının akciğerde meydana gelen hasarlara karşı koruyucu nitelikte olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2013). Liu ve arkadaşlarının fareler üzerinde yaptığı çalışmada, LPS uygulaması nedeniyle meydana gelen akut akciğer hasarına bağlı histopatolojik bulguların naringin uygulaması ile önemli ölçüde iyileştiği gösterilmiştir (Liu ve ark. 2011). 5-Fluorouracil uygulaması ile

süperoksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türevlerinin arttığı dolayısıyla akciğerde fibrozisin geliştiği bildirilmektedir. Bu durum toksik etkileri sebebiyle 5-FU'nun sitokin düzensizliği ve inflamasyona neden olması, fibroblastların aktivasyonu ile kollajen üretiminin artması ile açıklanabilir (Dani ve ark. 2004). Çalışmamızda 5-FU grubunda gözlemlediğimiz interstisyel fibrozisin naringin uygulaması ile önemli ölçüde azaldığını gördük. Bu durum naringinin, akciğerlerde inflamatuvar hücre birikimini ve dolayısıyla fibrozisi engellenmesi gibi olası mekanizmalarla açıklanabilir.

Apoptoz, aşırı ROS seviyesinden kaynaklanan ve hücrede inflamatuvar fazın proliferatif faza aniden değiştiğini gösteren bir belirteçtir. Apoptoz sürecinde kaspaz ailesi proteinlerinden olan Bax ve Bcl-2 proteinlerinin miktarlarında değişimler meydana gelir (Cui ve ark. 2018). Bax proapoptotik bir protein iken Bcl-2 antiapoptotik özelliktedir (Coşkun ve Özgür 2011). Çalışmamızda 5-FU grubuna ait kesitlerde yoğun Bax immünpozitifliği tespit edilirken, NA+5-FU grubunda ise Bax immünpozitifliğinin çok düşük olduğu görüldü ($p<0,05$). Bcl-2 immünpozitifliği bakımından kesitler değerlendirildiğinde ise kontrole göre 5-FU grubunda immünpozitifliğin önemli ölçüde az olduğu, naringin uygulanan gruptaki immünpozitifliğin ise 5-FU grubuna kıyasla fazla, kontrol grubuna kıyasla da az olduğu tespit edildi ($p<0,05$). Gelen ve arkadaşlarının yaptığı, 5-FU uygulamasının rat karaciğerinde meydana getirdiği hepatotoksosite ile ilgili çalışmada antiapoptotik protein olan Bcl-2 ekspresyonunun, 5-FU uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha düşük yoğunlukta olduğu gösterilmiştir (Gelen ve ark. 2017). Rashid ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yapmış olduğu 5-FU kullanımına bağlı böbrek toksisitesi ile ilgili çalışmada da, 5-FU uygulanan gruptaki böbrek kesitlerinde Bcl-2 ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı, Bax immünpozitifliğinin ise önemli düzeyde arttığı gösterilmiştir (Rashid ve ark. 2014). Gan ve arkadaşları 5-FU uygulaması ile bağırsak mukoza iltihabı oluşturdukları rat modelinde, Bax ve Bcl-2 mRNA ekspresyonunu analiz etmiş ve 5-FU grubunda Bax mRNA ifadesinin önemli düzeyde arttığını, Bcl-2 mRNA ifadesinin ise önemli düzeyde düştüğünü göstermişlerdir (Gan ve ark. 2020). Bu sonuçlar, naringinin histopatolojik yönden gösterilmiş olan koruyucu etkisini, iltihaplanma ve apoptozun ortadan kaldırılması üzerine de oldukça etkili olduğunu immünohistokimyasal açıdan da göstermektedir.

Organizmada var olan antioksidan savunma sistemi, vücudu ROS kaynaklı hücre hasarına karşı koruyan önemli bir sistemdir (Gelen ve ark. 2017). Oksidatif stres, artan ROS üretiminin veya antioksidan savunmanın azalmasının bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. 5-Fluorouracil uygulaması ile karaciğer ve böbreklerde ROS artışının ve önemli antioksidan enzimlerden olan GSH aktivitesinde azalmanın meydana geldiği bildirilmektedir (Gelen ve ark. 2018).

Ayrıca 5-FU uygulaması ile akciğerlerde reaktif oksijen türevlerinin arttığı ve oksidatif stres kaynaklı hasarın geliştiği (Al-Hamdany ve Al-Hubaity 2014a) ve bu durumun akciğerlerde, antioksidan savunma mekanizmasını inaktive ederek oksijene duyarlı hücrelerin ölümüne ve tipik bir alveolar hücre hasarına neden olabileceği gösterilmiştir (Teixeira ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda antiviral, antikanserojen, hepatoprotektif, kardiyoprotektif ve nöroprotektif etkileri olduğu gösterilmiş olan naringinin ise sıçan akciğerlerinde antioksidan seviyeyi artırarak doksorubisin kaynaklı oksidatif stresi durdurduğu bildirilmiştir (Jagetia ve ark. 2018).

Glutasyonun akciğerin antioksidan savunmasında kritik bir öneme sahip olduğu ve bilhassa solunum yolu epitelinin oksidatif hasardan ve inflamasyondan korunmasında vazgeçilmez bir yeri olduğu gösterilmiştir. Glutasyon seviyesindeki dengesizlikler, inflamatuvar akciğer hastalıklarında proinflamatuvar genlerin transkripsiyonuna yol açmaktadır (Özyurt ve ark. 2007). Mevcut çalışmamızda 5-FU uygulanan sıçanlara ait akciğer dokularında GSH seviyesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalmanın olduğunu, naringin uygulamasıyla ise GSH seviyesinde artışın meydana geldiğini tespit ettik. Bu durum 5-FU uygulanan sıçan akciğerlerinde hasar meydana geldiğini, naringinin de bu durum üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Serbest radikal türevlerinden biri olan nitrik oksit, organizmada aynı zamanda peroksinitrit anyonu ve hidroksil radikali gibi çok etkin başka radikallerin de üretilmesine neden olur. Bu radikaller dokulara zarar vermektedir ve doğrudan doğruya mitokondriyal solunum zincirini de inhibe etmektedirler (Yılmaz ve Fatmagül 2010). Giri ve ark. yapmış oldukları çalışmada bleomisin kaynaklı akciğer fibrozisinin patogenezesinde nitrik oksit üretiminin rol oynadığını tespit etmişlerdir (Giri ve ark. 2002). Yapılan başka çalışmalarda da 5-FU'nun endojen nitrik oksit oluşumu üzerindeki indükleyici etkisi tespit edilmiştir (Yin ve ark. 2007, Leitão ve ark. 2007). Çalışmamızda 5-FU grubunda kontrol grubuna kıyasla arttığını tespit ettiğimiz nitrik oksit seviyesi, 5-FU uygulaması ile histopatolojik olarak da tespit ettiğimiz akciğer hasarını ve oksidatif stresin oluştuğunu biyokimyasal olarak da göstermiş oldu. Bununla birlikte, 5-FU ile birlikte naringin uygulamasının akciğer dokularındaki nitrik oksit seviyesinde önemli ölçüde düşüşe sebep olduğunu tespit ettik. Bu durum da bize naringinin 5-FU kaynaklı akciğer hasarına karşı antifibrotik etkilerinin yanı sıra serbest radikallerin neden olduğu hasarı, oksidatif stresi hafifleterek ve inflamasyonu iyileştirerek gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonu genellikle ROS oluşumunun ve oksidatif stresin sonuçlarından biridir (Eskandari ve ark. 2015). 5-FU uygulamasından sonra gözlenen oksidatif stres, lipid peroksidasyonunda artışa neden olmaktadır (Santandreu ve ark. 2011). 5-FU uygulanan ratlara ait kalp dokusunda (Eskandari ve ark. 2015),

hamsterlarda 5-FU ile indüklenen oral mukozit olgusunda (Yoshino ve ark. 2013) ve yine ratlara verilen 5-FU ile karaciğer ve böbreklerde lipid peroksidasyonunda artış olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Gelen ve ark. 2018). Biz de çalışmamızda lipid peroksidasyonunu göstermek amacıyla akciğerlerde TBARS seviyesinin ölçümünü gerçekleştirdik. TBARS seviyesi 5-FU grubunda diğer gruplara oranla oldukça yüksekti. Bu durum da yine bize 5-FU'nun akciğerlerde antioksidan savunma sisteminde hasara ve lipid peroksidasyonunda artışa neden olduğunu gösterdi. Naringin uygulanan grupta TBARS seviyesinde meydana gelen anlamlı düzeydeki azalma naringinin oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu azalttığını göstermekteydi.

Mevcut çalışmamız, histopatolojik, immünohistokimyasal değerlendirmeler ve biyokimyasal testler sonucunda, sıçanlarda 5-FU ile indüklenen akciğer hasarına karşı naringinin koruyucu etkilerini göstermektedir.

Sonuç olarak 5-FU'nun akciğer dokusunda oksidan antioksidan dengesi bozarak hasara neden olduğu, inflamasyonu artırdığı gözlenmiş, naringinin ise antioksidan ve anti-inflamatuar etki göstererek 5-FU kaynaklı bu hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Konu ile ilgili yapılacak ileri düzey çalışmalar ile 5-FU kaynaklı akciğer hasarını azaltmada ya da engellemede naringinin alternatif tedavi yöntemi olarak yerini alacağı ve konuyla ilgili farklı çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (AÜHADYEK) 26/12/2019 tarihli, Karar No:2019/16-248 sayılı onayıyla etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abdel-Hamid NM, Fawzy MA, El-Moselhy MA.** Evaluation of hepatoprotective and anticancer properties of aqueous olive leaf extract in chemically induced hepatocellular carcinoma in rats. *Am. J. Med. Med. Sci.* 2011; 1(1):15–22.
- Adil M, Kandhare AD, Visnagri A, Bodhankar SL.** Naringin ameliorates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in rats: decisive role of KIM-1, Caspase-3, TGF- β , and TNF- α . *Ren Fail.* 2015; 37(8): 1396-1407.
- Al-Hamdany MZ, Al-Hubaity AY.** Protective effects of N-acetylcysteine against 5-fluorouracil-induced pulmonary toxicity in albino rats. *Iraqi J. Med. Sci.* 2014a; 12(2):139–149.
- Al-Hamdany MZ, Al-Hubaity AY.** The structural changes of the rat's lung induced by intraperitoneal injection of 5-fluorouracil. *J Pak Med Assoc.* 2014b; 64:734–738.
- Al-Jawaly NK, Al-Sadi H.** Histopathological Study of Lung, Testis, and Urinary Bladder of Mice Treated with 5-Fluorouracil. *Rafidain J. Sci.* 2017; 26(1):9–16.

- Alvarez-Cabellos R, Garcia-Carbonero R, Garcia-Lacalle C, Gomez P, Tercero A, Sanchez D, Paz-Ares L.** Fluorouracil-based chemotherapy in patients with gastrointestinal malignancies: influence of nutritional folate status on toxicity. *J. Chemother.* 2007; 19(6):744–749.
- Bhandari A, Bhandari V.** Bronchopulmonary dysplasia: an update. *Indian J. Pediatr.* 2007; 74(1):73–77.
- Chen Y, Nie Y, Luo Y, Lin F, Zheng Y, Cheng G, Wu H, Zhang K, Su W, Shen J.** Protective effects of naringin against paraquat-induced acute lung injury and pulmonary fibrosis in mice. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 58:133–140.
- Choi J-S, Piao Y-J, Kang KW.** Effects of quercetin on the bioavailability of doxorubicin in rats: role of CYP3A4 and P-gp inhibition by quercetin. *Arch. Pharm. Res.* 2011; 34(4):607–613.
- Chtourou Y, Slima A Ben, Makni M, Gdoura R, Fetoui H.** Naringenin protects cardiac hypercholesterolemia-induced oxidative stress and subsequent necroptosis in rats. *Pharmacol. Reports.* 2015; 67(6):1090–1097.
- Coşkun G, Özgür H.** Apoptoz ve nekrozun moleküler mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Derg.* 2011; 20(3):45–58.
- Cui J, Wang G, Kandhare AD, Mukherjee-Kandhare AA, Bodhankar SL.** Neuroprotective effect of naringin, a flavone glycoside in quinolinic acid-induced neurotoxicity: possible role of PPAR- γ , Bax/Bcl-2, and caspase-3. *Food Chem. Toxicol.* 2018; 121:95–108.
- Dani C, Cecchi A, Bertini G.** Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* 2004; 56(4):381–94.
- El-Sayyad HI, Ismail MF, Shalaby FM, Abou-El-Magd RF, Gaur RL, Fernando A, Raj MHG, Ouhitit A.** Histopathological effects of cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil (5-FU) on the liver of male albino rats. *Int. J. Biol. Sci.* 2009; 5(5):466.
- Eren H, Aydin HR, Tumkaya L, Kazaz IO, Kalkan Y, Kazaz SN, Mercantepe T, Horsanali MO, Yilmaz A.** Whortleberry protects kidney against the cisplatin-induced nephrotoxicity: an experimental study. *Ren. Fail.* 2018; 40(1):466–474.
- Eskandari MR, Moghaddam F, Shahraki J, Pourahmad J.** A comparison of cardiomyocyte cytotoxic mechanisms for 5-fluorouracil and its pro-drug capecitabine. *Xenobiotica.* 2015; 45(1):79–87.
- Famurewa AC, Asogwa NT, Aja PM, Akunna GG, Awoke JN, Ekeleme-Egedigwe CA, Maduagwuna EK, Folawiyo AM, Besong EE, Ekpono EU.** Moringa oleifera seed oil modulates redox imbalance and iNOS/NF- κ B/caspase-3 signaling pathway to exert antioxidant, anti-inflammatory and antiapoptotic mechanisms against anticancer drug 5-fluorouracil-induced nephrotoxicity in rats. *South African J. Bot.* 2019; 127:96–103.
- Formica J V, Regelson W.** Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem. Toxicol.* 1995; 33(12):1061–1080.
- Fouad AA, Albuali WH, Jresat I.** Protective Effect of Naringenin against Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Rats. *Pharmacology.* 2016; 97:224-232.
- Gan Y, Ai G, Wu J, Luo H, Chen L, Huang Q, Wu X, Xu N, Li M, Su Z.** Patchouli oil ameliorates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in rats via protecting intestinal barrier and regulating water transport. *J. Ethnopharmacol.* 2020; 250:112519.
- Gawish S, Omar N, Sarhan N.** Histological and ultrastructural study of 5-fluorouracil induced small intestinal mucosal damage in rats. *Asian J Cell Biol.* 2013; 8(1):1–21.

- Gelen V, Şengül E, Gedikli S, Atila G, Uslu H, Makav M.** The protective effect of rutin and quercetin on 5-FU-induced hepatotoxicity in rats. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* 2017; 7(7):647-653.
- Gelen V, Şengül E, Yıldırım S, Atila G.** The protective effects of naringin against 5-fluorouracil-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats. *Iran. J. Basic Med. Sci.* 2018; 21(4):404-410.
- Gien J, Kinsella JP.** Pathogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia. *Curr. Opin. Pediatr.* 2011; 23(3):305-313.
- Giri SN, Biring I, Nguyen T, Wang Q, Hyde DM.** Abrogation of bleomycin-induced lung fibrosis by nitric oxide synthase inhibitor, aminoguanidine in mice. *Nitric Oxide.* 2002; 7(2):109-118.
- Grande NR, Peão MND, de Sá CM, Águas AP.** Lung fibrosis induced by bleomycin: structural changes and overview of recent advances. *Scanning Microsc.* 1998; 12(3):487-494.
- Han R, Yang YM, Dietrich J, Luebke A, Mayer-Pröschel M, Noble M.** Systemic 5-fluorouracil treatment causes a syndrome of delayed myelin destruction in the central nervous system. *J. Biol.* 2008; 7(4):12.
- Hay J, Shahzeidi S, Laurent G.** Mechanisms of bleomycin-induced lung damage. *Arch. Toxicol.* 1991; 65(2):81-94.
- Hermenean A, Ardelean A, Stan M, Hadaruga N, Mihali C-V, Costache M, Dinischiotu A.** Antioxidant and hepatoprotective effects of naringenin and its β -cyclodextrin formulation in mice intoxicated with carbon tetrachloride: a comparative study. *J. Med. Food.* 2014; 17(6):670-677.
- Jagetia GC, Lalrinpuii T.** Naringin protects rat lung against the doxorubicin-induced biochemical injury. *MOJ Anat & Physiol.* 2018; 5(2):134-140.
- Jung G, Hennings G, Pfeifer M, Bessler WG.** Interaction of metal-complexing compounds with lymphocytes and lymphoid cell lines. *Mol. Pharmacol.* 1983; 23(3):698-702.
- Juranek I, Bezek S.** Controversy of free radical hypothesis: reactive oxygen species-cause or consequence of tissue injury? *Gen. Physiol. Biophys.* 2005; 24(3):263-278.
- Küçükler S, Özdemir S, Çomaklı S, Kandemir F.** Ratlarda İzoniazid Kaynaklı Akciğer Hasarına Karşı Krisinin Etkileri. *Kocatepe Vet. Derg.* 2020; 13(2):161-171.
- Kwatra M, Kumar V, Jangra A, Mishra M, Ahmed S, Ghosh P, Vohora D, Khanam R.** Ameliorative effect of naringin against doxorubicin-induced acute cardiac toxicity in rats. *Pharm Biol.* 2016; 54(4):637-647.
- Lamberti M, Porto S, Marra M, Zappavigna S, Grimaldi A, Feola D, Pesce D, Naviglio S, Spina A, Sannolo N.** 5-Fluorouracil induces apoptosis in rat cardiocytes through intracellular oxidative stress. *J. Exp. Cancer Res.* 2012; 31(1):60.
- Lee M-H, Yoon S, Moon J-O.** The flavonoid naringenin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. *Biol. Pharm. Bull.* 2004; 27(1):72-76.
- Leitão RFC, Ribeiro RA, Bellaguarda EAL, Macedo FDB, Silva LR, Oriá RB, Vale ML, Cunha FQ, Brito GAC.** Role of nitric oxide on pathogenesis of 5-fluorouracil induced experimental oral mucositis in hamster. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2007; 59(5):603-12.
- Leopoldini M, Russo N, Toscano M.** The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. *Food Chem.* 2011; 125(2):288-306.
- Liu Y, Wu H, Nie Y, Chen J, Su W, Li P.** Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF- κ B pathway. *Int. Immunopharmacol.* 2011; 11(10):1606-1612.
- Love WE, Bernhard JD, Bordeaux JS.** Topical imiquimod or fluorouracil therapy for basal and squamous cell carcinoma: a systematic review. *Arch. Dermatol.* 2009; 145(12):1431-1438.
- Matouk AI, Taye A, Heeba GH, El-Moselhy MA.** Quercetin augments the protective effect of losartan against chronic doxorubicin cardiotoxicity in rats. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2013; 36(2):443-450.
- Montanari A, Widmer W, Nagy S.** Health promoting phytochemicals in citrus fruit and juice products. *Funct. Food Phytochem.* Springer; 1997. p. 31-52.
- Naidu MUR, Ramana GV, Rani PU, Suman A, Roy P.** Chemotherapy-induced and/or radiation therapy-induced oral mucositis-complicating the treatment of cancer. *Neoplasia.* 2004; 6(5):423-431.
- Nora El-hoseany M.** Protective Effect of Captopril against 5-Fluorouracil-Induced Hepato and Nephrotoxicity in Male Albino Rats. *J. Am. Sci.* 2012; 8(2):680-685.
- Oršolić N, Gajski G, Garaj-Vrhovac V, Đikić D, Prskalo ZŠ, Sirovina D.** DNA-protective effects of quercetin or naringenin in alloxan-induced diabetic mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2011; 656(1-3):110-118.
- Özyurt H, Özyurt B, Söğüt S, Şahin Ş, Temel İ, Akyol Ö.** Bleomisin ile Olusturulan Akciğer Fibrozisinde Pürin Katabolizması Enzim Aktiviteleri Üzerine CAPE nin Etkisi. *Fırat Tıp Derg.* 2007; 12(3):168-172.
- Ramadori G, Cameron S.** Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Ann. Hepatol.* 2010; 9(2):133-143.
- Rashid S, Ali N, Nafees S, Hasan SK, Sultana S.** Mitigation of 5-Fluorouracil induced renal toxicity by chrysin via targeting oxidative stress and apoptosis in wistar rats. *Food Chem. Toxicol.* 2014; 66:185-193.
- Rašković A, Stilić N, Kolarović J, Vasović V, Vukmirović S, Mikov M.** The protective effects of silymarin against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Molecules.* 2011; 16(10):8601-8613.
- Renugadevi J, Prabu SM.** Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats. *Toxicolog.* 2009; 256(1-2):128-134.
- Said-Elbahr R, Nasr M, Alhnan MA, Taha I, Sammour O.** Nebulizable colloidal nanoparticles co-encapsulating a COX-2 inhibitor and a herbal compound for treatment of lung cancer. *Eur J Pharm Biopharm.* 2016; 103:1-12.
- Santandreu FM, Valle A, Oliver J, Roca P.** Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 2011; 28(2):219-228.
- Şengül E, Gelen V, Gedikli S, Özkanlar S, Gür C, Çelebi F, Çınar A.** The protective effect of quercetin on cyclophosphamide-Induced lung toxicity in rats. *Biomed. Pharmacother.* 2017; 92:303-307.
- Serafini M, Villano D, Spera G, Pellegrini N.** Redox molecules and cancer prevention: the importance of understanding the role of the antioxidant network. *Nutr. Cancer.* 2006; 56(2):232-240.
- Sghaier M Ben, Skandrani I, Nasr N, Franca M-GD, Chekir-Ghedira L, Ghedira K.** Flavonoids and sesquiterpenes from *Teucrium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure-activity relationship study. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2011; 32(3):336-48.
- Singh D, Chander V, Chopra K.** Protective effect of naringin, a bioflavonoid on ferric nitrilotriacetate-induced oxidative renal damage in rat kidney. *Toxicology.* 2004; 201(1-3):1-8.
- So F V, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK.** Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and

absence of excess estrogen. *Cancer Lett.* 1997; 112(2):127–133.

- Sobrero AF, Aschele C, Bertino JR.** Fluorouracil in colorectal cancer--a tale of two drugs: implications for biochemical modulation. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15(1):368–381.
- Stein A, Voigt W, Jordan K.** Chemotherapy-induced diarrhea: pathophysiology, frequency and guideline-based management. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2010; 2(1):51–63.
- Teixeira KC, Soares FS, Rocha LGC, Silveira PCL, Silva LA, Valença SS, Dal Pizzol F, Streck EL, Pinho RA.** Attenuation of bleomycin-induced lung injury and oxidative stress by N-acetylcysteine plus deferoxamine. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 2008; 21(2):309–316.
- Turgut NH, Kara H, Elagoz S, Deveci K, Gungor H, Arslanbas E.** The protective effect of naringin against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in Wistar rats. *Pulm. Med.* 2016;2016.
- Wong VKW, Shapourifar-Tehrani S, Kitada S, Choo PH, lee DA.** Inhibition of rabbit ocular fibroblast proliferation by 5-fluorouracil and cytosine arabinoside. *J. Ocul. Pharmacol.* 1991; 7(1):27–39.
- Yılmaz AB, Yur F.** Ratlarda deneysel akciğer fibrozisinde nitrik oksit oksidasyon ürünleri ve kan gazları düzeylerinin araştırılması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Vet. Fakültesi Derg.* 2010; 21(3):135–139.
- Yin X-Y, Jiang J-M, Liu J-Y, Zhu J-R.** Effects of endogenous nitric oxide induced by 5-fluorouracil and L-Arg on liver carcinoma in nude mice. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(46):6249.
- Yoshino F, Yoshida A, Nakajima A, Wada-Takahashi S, Takahashi S, Lee MC.** Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS One.* 2013; 8(12):e82834.

Pigeon in Konya Province Folklore: 1. Diseases and Their Treatments

Aşkın YAŞAR¹, Esra ÇELİK^{1*}, Gökhan ASLIM¹

¹Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary History and Deontology, 42003, Konya, Turkey

ABSTRACT

With this study, it was aimed to bring verbal, written and visual data, which have folkloric characteristics for diseases and treatments of pigeon breeding in Konya into the literature, and contribute to the Turkish cultural heritage and to shed light on veterinary science studies. The material of the study was composed of the information obtained from 28 sources, consisting of pigeon breeders in Konya, through the "Information Collection Form". The findings of the study were given under the headlines of external and internal diseases, parasitic diseases and epidemics. It was determined that, the data of the study shows similarities to the data obtained through the literature reviews; For example; "applying oil to the trichophytic area, cutting the papilloma skin with the help of a knife" were determined as rational methods, and "removing the leg feathers of the paralyzed pigeon and making cuts in the head and legs" were determined as empirical methods. It can be said that some methods applied in this study carried out in Konya are generally compatible with scientific data and rational, but some empirical methods still exist in folk culture, and there are areas in need of research in terms of veterinary science for pigeon diseases and treatments.

Keywords: Disease, folklore, folkloric veterinary medicine, Konya, pigeon

Konya İli Folklorunda Güvercin: 1. Hastalıklar ve Tedavileri

ÖZ

Bu çalışma ile Konya ili güvercin yetiştiriciliğinde hastalıklar ve tedavilerine yönelik folklorik niteliği olan sözlü, yazılı ve görsel verilerin literatüre kazandırılarak Türk kültür mirasına katkı sağlanması ve veteriner bilimleri alanı çalışmalarına ışık tutulması amaçlandı. Çalışmanın materyalini, çeşitli kaynaklardan yararlanılarak konuya özel olarak hazırlanan "Bilgi Derleme Formu" aracılığıyla Konya ilinde güvercin yetiştiricilerinden oluşan 28 kaynak kişiden elde edilen bilgiler oluşturdu. Çalışmanın bulguları dış ve iç hastalıklar, paraziter hastalıklar ve salgın hastalıklar başlıkları altında verildi. Çalışmanın verilerinin, gerçekleştirilen literatür taramaları ile elde edilen verilere benzerlik gösterdiği, örneğin; "mantarlı bölgeye yağ sürülmesi, sigil olan derinin bıçak ile kesilmesi" gibi uygulamalar Konya ili folklorik veteriner hekimliğinde yer etmiş rasyonel yöntemler, "felçli güvercinin paçalarının yolunarak, kefa ve paçalarına kesik atılması" gibi uygulamalar ise ampirik tedavi yöntemleri olarak belirlendi. Konya ilinde gerçekleştirilen folklorik nitelikli bu çalışmada uygulanan bazı yöntemlerin bilimsel veriler ile genel olarak uyumlu ve rasyonel olduğu, ancak halk kültüründe varlığını koruyan bir takım ampirik yöntemlerin de halen varlığını devam ettirdiği ve güvercin hastalıkları ve tedavilerine yönelik veteriner bilimleri açısından araştırılmaya muhtaç alanlar olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Folklor, folklorik veteriner hekimliği, güvercin, hastalık, Konya

To cite this article: Yaşar A, Çelik E, Asım G. Pigeon in Konya Province Folklore: 1. Diseases and Their Treatments. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1): 26-36

Submission: 10.09.2020 Accepted: 22.01.2021 Published Online: 02.02.2021

ORCID ID; AY: 0000-0001-8641-6207, EÇ: 0000-0002-7836-6171, GA: 0000-0001-5976-8186

*Corresponding author e-mail: esra.celik@selcuk.edu.tr

Folklorun önemli bir bölümünü oluşturan ve Türk folklorunun önemli değerlerinden biri olan halk hekimliği (Sinmez 2011), toplumların hastalıklar ve sağlık hakkındaki inanç, tutum, davranış, gelenek ve değer sistemleri ile ilgili tıbbi uygulamaları olarak tanımlanabilir (Şar 2005).

İnsan ve hayvan hekimliği uzun yıllar bir arada yoğrulmuş, insanlar kendilerine uyguladıkları tedavi şekillerini hayvanlar üzerinde de denemeye başlamış ve böylece folklorik veteriner hekimliği (halk veteriner hekimliği) doğmuştur (Dinçer 1967).

Kalıplaşmış bilgi ve davranış olarak biçimlenen inanç ve uygulamalar nesilden nesile sözlü ve uygulamalı yollar ile sistematik olarak aktarılmış, ancak değişen zaman ve şartlara göre geleneksel ve bilimsel uygulamalar birlikte kullanılmaya başlanmıştır (Sever 2004). Alptekin'e (2018) göre, Türkiye'de halk halen kendi yöntemleri ile hastalıkları tedavi etmektedir. Yaşanılan coğrafya, toplumun kültür yapısı gibi faktörler günümüz insanların halk hekimliğine yönelmelerindeki önemli unsurlar olarak karşımıza çıkar. Özellikle de köylüler arasında eski inançların varlığını koruduğu ve nesilden nesile aktarılan bu bilgilerin kökeninin asırlar öncesine dayandığı bilinir. Geçmişte olduğu gibi günümüzde de köylü ve kentli fark etmeksizin halk herhangi bir hastalık durumunda veteriner hekime danışmak yerine öncelikle kendi metotlarını uygulamayı tercih etmektedir (Dinçer 1967, Alptekin 2018).

Türkiye'nin birçok bölgesinde folklorik veteriner hekimliği kapsamında yapılan çalışmalarda folklorik uygulamaların dini-sihri, ampirik ve rasyonel tedavi yöntem ve tekniklerine dayandığı ve özellikle rasyonel uygulamaların modern veteriner hekimliği uygulamaları ile paralellik gösterdiği görülmektedir (Dinçer 1967, Arslan 1998, Sinmez 2011, Yüksel 2012, Yaşar ve ark. 2013, Avcı ve Özen 2016, Sinmez ve Aslım 2017, Sinmez ve ark. 2018).

Türkiye'nin birçok bölgesinde köklü bir güvercin yetiştiriciliği geleneği mevcut olup, bu gelenek oldukça canlı bir biçimde yaşatılmaya devam etmektedir. Özmen (1981)'in Konya ili merkezinde gerçekleştirdiği folklorik nitelikli bir araştırma, güvercin yetiştiriciliğinin Konya'da ne kadar köklü bir geçmişe dayandığını göstermiş olup, koruyucu uygulamalar ve tedavi yöntemlerinin de geçmişten günümüze aktarıldığına da işaret etmiştir.

Bu çalışma ile Konya ilinde bir değer olarak görülen ve hobi amacıyla yetiştiriciliği yapılan güvercinlerin sık karşılaşılan hastalıkları ve tedavilerine yönelik folklorik niteliği olan sözlü, yazılı ve görsel verilerin literatüre kazandırılarak Türk kültür mirasına katkı sağlanması ve veteriner bilimleri alanı çalışmalarına ışık tutulması amaçlandı.

Çalışmanın materyalini, Konya ilinde kaynak kişilerden yüz yüze görüşme yoluyla elde edilen yazılı, sesli ve görsel folklorik bilgiler oluşturdu. Yazılı materyali, Sinmez (2011), Yüksel (2012), Yaşar ve ark. (2013)'dan da yararlanılarak hazırlanan "*Bilgi Derleme Formu*" aracılığıyla 11.07.2020-14.08.2020 tarihleri arasında elde edilen bilgiler oluşturdu. Sesli materyal, bilgi derleme formu çerçevesinde yazıya aktarıldı. Görsel materyal kaynak kişilere ait güvercin yetiştirme alanlarından fotoğraflanarak elde edildi. Güvercin hastalıkları ve tedavileri ile ilgili elde edilen folklorik bilgilerin analizi yapıldı.

Meram Güvercin Severler Derneği Başkanı ile yapılan görüşme neticesinde tanınan ve konuyla ilgili bilgi sahibi olduğu belirlenen güvercin yetiştiricilerinden oluşan 28 kaynak kişi ile görüşüldü. Araştırmada, kaynak kişilere "*Bilgi Derleme Formu*" yoluyla, yedi bölümden oluşan 101 soru yöneltildi.

Görüşme yapılan kaynak kişiler ilçe ve görüşme tarihine göre kodlanarak (K1, K2..., K28) metin içerisinde üst indis şeklinde belirtildi ve indis bilgileri "*sonmol*" olarak sunuldu. Kaynak kişilere ait bilgiler ise "*kaynak kişi listesinde*" detaylı olarak (adı-soyadı, doğum yılı, eğitim seviyesi, mesleği, yaşadığı ilçe, görüşme tarihi) sunuldu.

BULGULAR

Bir işi iyi bilen, hekimliği iyi olan kimselere "*ocak*" adı verilir.¹ Güvercin yetiştiriciliğinde de genellikle uzun yıllardır bu işi yapan ve tedavi yöntemlerini iyi bilen yetiştiricilerin tıpkı "*ocaklar*" gibi hastalıklara müdahale ettiği bilinir. Herhangi bir hastalıkta oluşan ağrıya halk arasında "*engi*" adı verilir.²

Güvercinlerde sık karşılaşılan hastalıklar ve tedavileri ile ilgili tespit edilen folklorik nitelikli bulgular aşağıda başlıklar halinde sunuldu.

Dış ve İç Hastalıklar

Apse

Apseye halk arasında "*ur*" adı verilirken (Resim 1)³, apsenin katılaştığı haline ise "*peynirleşti*" ifadesi kullanılır.⁴ Apseler genellikle stres, yer değişikliği, kötü barınma şartları sebebiyle görülen bir rahatsızlık olarak bilinir.⁵ Genellikle kanatta ve bacaklarda olmak üzere tüm vücutta görülebilir.⁶

Apseler genellikle tüleme zamanlarında kelleşme ile fark edilir.⁷ Tedavide, olgunlaşan apse jilet ile kesilir ve içi temizlenir.⁸ Daha sonra bölgeye tentürdiyot⁹, katran¹⁰, krem sürülür, sigara külü¹¹, deniz tuzu ve göztaşları basılır¹², antibiyotikli pomat uygulanır¹³, ozon ya da asit dökülerek yakılır.¹⁴ İçi temizlenen apseye göztaşları uygulaması ile tedavide kesin sonuç alınmadığı da bildirilir.¹⁵



Resim 1. Gözde apse¹⁶
Figure 1. Abscess in the eye

Göz Nezlesi

Göz sulanmasına “*triko*” ya da “*nezle*” adı da verilir.¹⁷ Bu rahatsızlıkta özellikle yavru güvercinlerde göz akıntısı görülür.¹⁸ Tedavide limon ve sarımsak karışımından yapılan turşu içirilir¹⁹, beşeri göz damlaları kullanılır²⁰, gözün içerisine tükürülür²¹, göze sirke²² ya da limon damlatılır.²³

Kanat Tutulması

Kanat tutulmasına “*yel tutması*” ya da “*yel girmesi*” adı da verilir.²⁴ Genellikle ham iken uçurulan, sürekli kümeste tutulan ya da hava akımından etkilenen güvercinlerin kanadında görülen bu rahatsızlıkta kanat tutulur, düşer, kanat sesi kaybolur ve güvercin uçamaz. İyileşme genellikle kanat sesinin duyulması ile anlaşılır.²⁵ Diğer güvercinlerin rahatsızlık vermemesi için kanadı tutulan güvercin izole edilerek²⁶ masaj yapılır²⁷, hareket ettirilmez, uçmaya zorlanmaz ve buzlu suya daldırılarak şok uygulanır.²⁸ Tedavide güvercinin kanat tüyleri yolunur²⁹, tutulan kanadı yere sürtüyorsa kanat telekleri bir miktar kesilir.³⁰ Sıcak ortamda tutulduğu takdirde yaklaşık beş-on gün içerisinde iyileşebilir.³¹ İyileşmediği takdirde bu rahatsızlığa “*demir kanat*” adı verilir ve bu güvercinler değerli ise damızlık olarak kullanılmaya devam edilir.³²

Paraliz (Felç)

Paraliz güvercinin herhangi bir yerinde görülebilir.³³ Bu rahatsızlık güvercinin neresinde görülürse, vücudunun o kısmı hareket edemez.³⁴ Bu durum genellikle kümes değişikliği vb. stres unsurları sebebiyle ortaya çıkar.³⁵ Bu güvercinler ayrı bir yere alınarak bakım ve beslemesi yapılır.³⁶ Felçli bölge ovularak muhtemel pıhtı oluşumları giderilmeye çalışılır.³⁷ Kafada oluşan paralizilerde kafayı dik tutamaz ve yan döner ancak kafada titreme görülmez³⁸, yem yemede ve su içmede zorluk yaşar.³⁹ Tedavide boyun, kanat ve kuyruk tüyleri makas yardımı ile kesilir ya da yolunur⁴⁰; boyun

tüyleri yolunur ve o bölgeye jilet yardımı ile kesik atılır⁴¹; kafa döndüğü yönün aksine doğru çevrilir ya da çekilir.⁴²

Başka bir uygulamada ise; güvercinin boyun, kuyruk ve kanat tüyleri kesilir veya yolunur. Yolunan tüyler çıkana kadar iyileşmez ise hastalığın tedavi olmayacağına inanılır. Bazen de paçalar yolunur, kafa ve paçalarına jilet yardımı ile kesik atılır. Ayak felcinin tedavisinde ise; kan dolaşımını sağlamak için sadece paça tüyleri yolunur.⁴³

Siğil (Papillomatosis), Kist ve Mantar (Trichophytosis)

Siğil ve kistler güvercinlerde genellikle gaga, ayak, parmak ve kloakal bölgede küçük şişlikler olarak görülür.⁴⁴ Tedavide siğil olan deri bıçak yardımı ile kesildikten sonra bölgeye tentürdiyot sürülür.⁴⁵ Mantarın ise genellikle güvercinlerin ayaklarında görüldüğü bildirilir.⁴⁶ Tedavide mantarlı bölgeye zeytinyağı sürülür ve mantar görülen ayak tırnakları uzadıkça kesilir.⁴⁷

Topallık

Ayak topallığında güvercin ayağının üzerine basamaz ve sürekli yatar.⁴⁸

Yara Tedavisi

Yaraların tedavisinde genellikle bölgeye katran sürülür.⁴⁹ Katrana halk arasında “*karasakız*”⁵⁰ ya da “*bise*” adı da verilir.⁵¹

Sindirim Rahatsızlıkları

Güvercinlere taşlık sağlığı için çoğunlukla kum, kil toprak, mozaik ve yeşillik yedirilir.⁵² Sindirimi rahatlatmak için yumurta kabuğu, çay posası, tuz ve şeker karışımı günlük diyetlerine eklenir.⁵³

Yumurta Sıkışması

Yumurta sıkışması genellikle genç güvercinlerde görülür ve güvercin hastalıkları alanında uzmanlaşmış veteriner hekim yetersizliğinden dolayı bu gibi

durumlarda profesyonel yetiştiriciler müdahale eder.⁵⁴ Yumurta sıkışmasının sebep olduğu duruma halk arasında “yumurta felci” ya da “ayak felci” adı da verilir.⁵⁵ Yumurta sıkışmasında güvercin bir süre yumurtlayamaz, ayakları basamaz, kanatları yardımı ile hareket etmeye çalışır, az yem tüketir ve bu durum birkaç gün devam eder, ancak güvercinin iyileşemediği durumlar da görülebilir.⁵⁶

Yumurta sıkışmasında yaklaşık üç-dört gün şırınga yardımı ile beslenme ve vitamin takviyesi yapılır⁵⁷; Kloakaya vazelin veya zeytinyağı damlatılır⁵⁸; Zeytinyağı içirilir⁵⁹; Kan akışını hızlandırmak için paçalar yolunur⁶⁰. Abdomenden kloakaya doğru ovmak suretiyle sıkışan yumurta çıkarılmaya çalışılır⁶¹ ya da kloakaya doğru itildikten sonra beliren yumurtanın zarı jilet yardımı ile kesilir ve yumurta çıkarılır.⁶² Her türlü müdahaleye rağmen çıkarılamadığı durumlarda yumurta çok dengeli bir şekilde kırılarak kloakadan dışarı alınır.⁶³ Diğer güvercinler tarafından rahatsız edilmemeleri için hasta güvercinler ayrı bir ortama alınarak, önüne yem ve su konur⁶⁴ ve vitamin takviyesi yapılır.⁶⁵

Yumurta sıkışmasında zorlanma sebebiyle kloakal prolapsus görülebilir. Kloakal prolapsusa halk arasında “kıçı çıkmış” denir.⁶⁶ Prolabe olan kloaka zeytinyağı yardımı ile reddedilir.⁶⁷

Yumurta sıkışmasının önlenmesi için yumurtlama dönemlerinde güvercinlere zeytinyağı içirilir.⁶⁸ Yumurta dönmesi durumunda ise el ile müdahale edilerek düzeltilir.⁶⁹

Paraziter Hastalıklar

Konya’da güvercinler ile ilgili bilinen iç parazitler kurt, bağırsak solucanı, şerit, tenya, solucan; dış parazitler ise at sineği, bit, pire, uyuz ve kenedir.⁷⁰ İç parazitlerin tedavisinde içme suyuna göztaşı katılır.⁷¹

Keneye halk arasında “gene” denir.⁷² Sadece tülek (tüy dökümü) zamanı değil, aynı zamanda parazitin sebep olduğu tüy dökümü ile ortaya çıkan çıplaklığa da “kel olmak” ifadesi kullanılır.⁷³

Coccidiosis

Bu hastalıkta yeşil renkte ishal görülür. Hava akımı veya soğukta kalan güvercinlerde meydana geldiğine inanılır.⁷⁴

Tedavisinde güvercinlere çay posası, tuz ve şeker karışımı⁷⁵ ya da pirinç ve çay posası karışımı yedirilir.⁷⁶

Trichomoniasis

Güvercinlerde görülen *Trichomoniasis*’e halk arasında “peynirleşme”, “kursak mantarı”, “sarı yara”, “pamuk”, “iç çiçek” ya da “ağz yolu iltihabı” gibi isimler verilir.⁷⁷

Peynirleşme odaklarının ağız içinde oluşmasına “ağz içi peynirledi”, peynirleşmenin ileri bir boyutta olmasına ise “urlaştı” ifadeleri kullanılır.⁷⁸

Bu hastalıkta ağız ve boğazda peynirleşme⁷⁹, yem yiyememe⁸⁰, zayıflama⁸¹, yüksek ateş, su tüketiminde artış ve kursak şişmesi görülür.⁸²

Tedavisinde kırmızı kil içme sularına katılır⁸³; sirke veya sarımsak verilir⁸⁴; balık yağı içirilir⁸⁵; sarımsaklı

turşu suyu ve veteriner preparatları kullanılır.⁸⁶ Yaklaşık bir ml ozon, bir mercimek tanesi büyüklüğünde göztaşı, 18 lt su karışımı iki gün dinlendirildikten sonra güvercinlere içirilir.⁸⁷

Bir adet limon, dört baş sarımsak, 200 ml sirke ve beş lt su karışımının 20 gün süresince serin bir yerde dinlendirilmesi suretiyle hazırlanan sarımsak-limon turşusu tedavide kullanılır.⁸⁸ Bazen de sadece 200 ml sirke ve beş lt su karışımı hazırlanarak güvercinlere içirilir.⁸⁹

Ayrıca güvercinin tüyü ayakkabı boyasına değdirilerek peynirleşen bölgeye sürülür⁹⁰ ve bölge ozon ile pansuman yapılır⁹¹ ya da kulak çöpü yardımı ile ağız ve boğaz içindeki peynirleşen yerler temizlenir, peynirleşme odakları fazla ise temizlendikten sonra kanatılarak tuzlu su ile pansuman yapılır.⁹²

Başka bir uygulamada ise; kulak çöpü ya da kuyruk tüyü yardımı ile peynirleşme odaklarına mürekkep, betadin veya viks sürülür. Bu işleme “harbi yapmak” adı verilir.⁹³ Bazen de peynirleşme odakları cımbız yardımı ile uzaklaştırılır⁹⁴ ya da dağlanır.⁹⁵

Peynirleşme özellikle geniş kursaklı olan balon güvercinlerinde daha sık görülür.⁹⁶ Bu hastalığa yakalanan balon güvercinleri bir pet şişenin içerisine dik konumda yerleştirilerek yaklaşık bir gün süresince bekletilir ve bu uygulamanın kursak şişliğine iyi geldiğine inanılır.⁹⁷ Kursak şişliğini tedavi etmek için, kursak delinerek içi boşaltıldıktan sonra dikilir ancak bu yöntemin tedavide etkili olmadığı da bildirilir.⁹⁸

Kursağa bastırılarak kusturulmak suretiyle kursak içeriği boşaltılır, ateş düşürücü ve antibiyotik ilaç içirilir⁹⁹ ya da sarımsak yedirilir.¹⁰⁰ Aynı zamanda bu hastalığın ölümcül olduğu, tedavisinin mümkün olmadığı da ifade edilir.¹⁰¹

Paraziter Hastalıklarda Koruyucu Tedavi

Güvercinleri paraziter hastalıklardan korumak için; kümese yabancı güvercin alınmaz¹⁰², eğer alınacak ise ayakları ozon ile dezenfekte edilir.¹⁰³ Ayrıca parazit olmaması için yuvalıklarda çam pürü tercih edilir.¹⁰⁴ Gelincikleri uzak tutmak için kümes etrafına katran sürülür.¹⁰⁵

Dış parazitlerden korumak için kümes ozon ile temizlenir¹⁰⁶, sık aralıklarla banyo suyu konulur¹⁰⁷, banyo sularına ozon ya da sirke (beş lt su, 50 ml sirke) katılır.¹⁰⁸ At sineğinden korumak için kanat altlarına pire tozu uygulanır.¹⁰⁹

İç parazitlerden korumak için içme sularına elma sirkesi (10 lt su, 250 ml sirke)¹¹⁰, ozon (iki ml ozon, üç ml su)¹¹¹, göztaşı (20 lt suya bir nohut tanesi kadar)¹¹² katılır ya da veteriner preparatları kullanılır.¹¹³ Ayrıca bu amaçla güvercinlere vitamin takviyesi yapılır ve kırmızı kil yedirilir.¹¹⁴

Genel olarak tüm parazitlerden korumak için; bir adet limon, üç-dört diş sarımsak, bir yemek kaşığı sirke ve iki-üç dal yaş nane karışımı yaklaşık 15-20 gün dinlendirildikten sonra güvercinlere içirilir.¹¹⁵ Aynı amaçla belirli aralıklar ile turşu suyu içirilir¹¹⁶ ve semizotu¹¹⁷ yedirilir.

Salgın Hastalıklar

Salgın hastalıklara halk arasında “bulaşıcı”, “yayılıcı” ya da “serpici” adı da verilir.¹¹⁸

Adenovirus Enfeksiyonları (Genç Kuş Hastalığı)

Adenovirus enfeksiyonuna, ateşlenme görülmesi sebebiyle “sıtma” adı verilir.¹¹⁹ Genellikle mugluf dönemindeki (yaklaşık iki aylık) güvercinlerde görülür. Bu hastalığın güvercinin tüy dökümüne gireceği ya da tüy dökümünden çıkamadığı (Resim 2) zamanlarda

görülmesine inanılır. Tüyünü atamaz, strese girer ve tüm vücutta şişkinlik olur. Ayrıca yavrunun iyi beslenemeyip soğukta kaldığı durumlarda da görülebildiği bildirilir.¹²⁰

Bu hastalıkta ateş, halsizlik, ishal, yem yememe, zayıflık, su tüketiminde artış görülür.¹²¹ Tedavide kursak içeriği boşaltılır ve vitamin içirilir.¹²² Mugluf döneminde tüylerini atabilmesi için bel üstü tüyleri yolunur ancak etkin bir tedavinin mümkün olmadığı da ifade edilir.¹²³



Resim 2. Son azıları atamamış tülekteki güvercin¹²⁴

Figure 2. The pigeon in the moult that has not casted the last feather

Coryza (Catarrh/Akut Nezle)

Bu hastalığa yakalanan güvercinlerin ciğerlerinden “fıçfıç”, “vukvuk”, “hukhuk” benzeri sesler gelmesi sebebiyle bu hastalığa halk arasında “fıçfıç”, “vukvuk”, “hukhuk” ya da “ciğer hastalığı” adı da verilir.¹²⁵

Ciğerlerde hırıltı, gözlerde sulanma ve burun akıntısı (sümük)¹²⁶ görülür. Hastalık yem ve sudaki kontaminasyon ve barınak ortamının kirliliği sebebiyle ortaya çıkar.¹²⁷

Bazen boğaza tüy kaçtığı durumlarda da “hukhuk” benzeri ses çıktığı için ayırt edici tanıda güvercinin kendi tüyü ıslatıldıktan sonra kursağa kadar indirilerek bölge temizlenir. Ses gelmeye devam ettiği takdirde güvercinin hasta olduğu anlaşılır.¹²⁸

Enterit (İshal)

Bu rahatsızlığa halk arasında “amel”, “ötürek” ya da “ötürük” adı verilir.¹²⁹ Salmonella’da dışkı koyu yeşil ve kokulu iken, E. coli’de beyaz renkte olduğu bildirilir.¹³⁰

Tedavide mangal közü ve pirinç ezilerek yedirilir¹³¹, çay posası, tuz ve şeker karışımı¹³² ya da kuru kahve ve pirinç karışımı verilir.¹³³

İç mantar

İç mantar sindirim sisteminde (bağırsaklarda) görülen bir rahatsızlıktır.¹³⁴ Tedavide güvercinlere göztaşı yedirilir.¹³⁵

Newcastle

Bu viral hastalığa halk arasında “veba”, “ölet” ya da “karan” adı verilir. Veba hastalığının görülmesine ise “karan geldi” ya da “veba kargını” denir.¹³⁶

Bu hastalıkta kafada titreme, gözlerde sulanma, hırıltılı solunum, iştahsızlık, sulu yeşil ishal, su tüketiminde artış, halsizlik, zayıflama, tüyleri kabartma (buruşma), üşüme, uçamama gibi klinik belirtiler görülür.¹³⁷ Hayvanların üşüme haline “büzütüyor” adı verilir.¹³⁸

Güvercinin ateşlendiği için su tüketiminin arttığı ve çok su tükettiği için kafanın arkaya doğru gangrılması (kafayı arkaya doğru atması) neticesinde hastalığın veba olduğunun anlaşıldığı ifade edilir.¹³⁹

Kış aylarında güvercin gübresinin kümeşte nem yapması sebebiyle vebaya sebep olduğuna¹⁴⁰ ve peynirleşme hastalığının vebaya çevirdiğine inanılır. Tedavisinin mümkün olmadığı bildirilir.¹⁴¹

Paramyxovirus 1 Enfeksiyonu

Paramyxovirus 1 enfeksiyonuna halk arasında “kafa dönmesi”, “titrek felci”, “titrek baş” ya da “sallabaş” (Resim 3) adı verilir.¹⁴² Güvercinlerde gerçekleşen herhangi bir paraliz sonrasında bu enfeksiyonun ortaya çıktığına inanılır.¹⁴³

Bu hastalıkta kafada titreme, kafayı dik tutamama, boyunda kısmi ya da tam paralizi ve bükülme (tortikollis) görülür. Kafa ters döner veya yana doğru kayar.¹⁴⁴ Bu hastalığın genellikle sıcak olan kümeslerde yüksek ateşten dolayı¹⁴⁵ ya da veba geçiren

güvercinlerde iyileştikten sonra görüldüğüne inanılır.¹⁴⁶

Tedavisinde kan dolaşımını hızlandırmak için kafadan başlayarak boyun, kanat ve kuyruk tüyleri yolunduktan sonra, güvercin karanlık bir yerde dinlendirilir¹⁴⁷; güvercinin heyecanını gidermek amacıyla soğuk su ile şok uygulanır; pis kanı uzaklaştırmak için kuyruk tüyü burun içine batırılarak kan akıtılır¹⁴⁸; güvercinin boynu jilet yardımı ile kesilir.¹⁴⁹ Ayrıca ensede belirgin olarak bulunduğu

ifade edilen siyah noktadan tüyler çekilir ve o bölgeye jilet yardımı ile kesik atıldıktan sonra hasta güvercin izole ve karanlık bir ortamda dinlendirilir.¹⁵⁰

Üreme dönemlerinde kafesteki diğer güvercinlerin zarar vermemeleri için hasta güvercinler ayrı kafeslere alınır.¹⁵¹

Tedavi için en az iki aylık bir zamana ihtiyaç duyulduğu ancak çoğu zaman tedaviye cevap alınmadığı¹⁵², iyileşse dahi bu hastalığın güvercinlerde kalıcı hasar (eser) bıraktığı bildirilir.¹⁵³



Resim 3. Sallabaş (*Paramyxovirus 1*) hastalığına yakalanan güvercin¹⁵⁴
Figure 3. Pigeon with sallabaş (*Paramyxovirus 1*) disease

Poxvirus Enfeksiyonları

Poxvirus enfeksiyonuna halk arasında “çiçek” ya da “dış çiçek” adı verilir. Çiçek hastalığında gözde şişme ve sulanma, gaga, göz kenarları, ağız çevresi ve vücudun diğer tüysüz bölgelerinde siğil benzeri oluşumlar görülür.¹⁵⁵ Bu oluşumların patlamasına ise “çatlak” adı verilir.¹⁵⁶

Lezyonlar ağız bölgesinde görüldüğü takdirde “ağzı çiçeklenmiş” ifadesi kullanılır.¹⁵⁷ Poxvirus enfeksiyonları bulaşıcı olması sebebiyle hasta güvercinler izole edilir.¹⁵⁸

Bu hastalığın dişi ve erkek olmak üzere iki formu bulunduğu, dişisinin tehlikeli, erkeğinin ise iyi huylu olduğuna inanılır.¹⁵⁹

Tedavisinde göztaşı ve vazelin karışımı lezyonların görüldüğü bölgelere sürülür¹⁶⁰; içme sularına göztaşı (20 lt suya bir nohut tanesi kadar)¹⁶¹; banyo sularına ise göztaşı, ozon veya sirke eklenir.¹⁶² Kulak çöpü yardımıyla ayakkabı boyası veya mürekkep çiçek lezyonlarının olduğu bölgelere sürülür.¹⁶³ Çiçek lezyonları kesildikten sonra bölge dağlanır.¹⁶⁴ Lezyonların bulunduğu bölgelere ısı uygulanır ve kanatıldıktan sonra göztaşı basılır.¹⁶⁵

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan literatür taramalarında güvercinler ile ilgili az sayıda çalışma olduğu, bununla beraber konu ile ilişkili folklorik nitelik taşıyan çalışma sayısının ise yetersiz

olduğu ve Özmen’in 1981 yılında gerçekleştirdiği çalışmanın, güvercin temalı tek folklorik nitelikli çalışma olduğu belirlendi.

Güvercin hastalıklarını teşhis edecek veteriner hekim sayısının az olmasının, güvercin yetiştiricileri tarafından sürekli ve ısrarlı bir şekilde gündeme getirilen bir konu olduğu, aynı zamanda hastalık teşhis edilse dahi tedavi için kullanılacak ilacın temini hususunda sıkıntılar yaşandığı bildirilmektedir (Yılmaz ve Boz 2012). Çalışmada, yetiştiricilerin güvercin hastalıkları alanında uzmanlaşmış veteriner hekim sayısının az olmasından dolayı sıkıntı yaşadıkları, dolayısıyla hastalık durumlarında profesyonel yetiştiricilerin yardımına başvurdukları ya da bizzat kendilerinin müdahale ettikleri; ayrıca güvercin hastalıklarında kontrolsüz ve bilinçsiz ilaç kullanıldığı ve her yetiştiricinin bu doğrultuda bir ilaç stoku olduğu değerlendirildiğinde güvercin hastalıkları konusunda uzmanlaşmış veteriner hekimlere ihtiyaç olduğu, gerekirse veteriner hekimlere bu konuda özel eğitim programları düzenlenmesi gerektiği önerilebilir. İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümünde gerçekleştirilen çalışmada apse tedavisinde, şişliğin sivri uçlu bıçakla delinip içerisinin ispirto ile temizlendiği, katran ve gres yağının bölgeye sürüldüğü, apse dışta ise bölgenin ateşle dağlanıp, üzerine katran sürüldüğü ya da apseye kızmış tava ile sıcak kompresler yapıldığı ve göztaşının toz halinde açık apselerin antiseptisinde kullanıldığı (Yaşar ve ark.

2013) verilerine paralel olarak çalışmada da olgunlaşan apsenin (Resim 1) jilet ile kesilip içinin temizlenmesi ve daha sonra bölgeye katran, krem, sigara külü, deniz tuzu ve göztaşı uygulanması, apsenin ozon ya da asit dökülerek yakılması, içi temizlenen apseye göztaşı uygulanması, İç Anadolu Bölgesinde hayvancılıkta denenen metotlarının güvercinlere de uygulandığı ve genel olarak hayvanlarda apse tedavisinin benzer şekilde yapıldığı ifade edilebilir.

Özmen (1981), güvercinlerde felcin ayakta, kanatta ve başta görülebildiğini, bu durumda ayak ve kanadın hareket edemediğini, başta görüldüğü takdirde başın aşağı doğru sarktığını ve ters döndüğünü, felç olan güvercin ilk on günde ölmezse kurtulma şansının arttığını bildirmektedir. Çalışmada paralizin, güvercinin herhangi bir yerinde görülebilmesi ve vücudun paralizli kısmının hareket edememesi bilgisinin Özmen'in verilerine paralel olduğu; Özmen'in verilerinden farklı olarak bu güvercinlerin ayrı bir yere alınarak bakım ve beslemesinin yapıldığı, felçli bölgenin ovularak muhtemel pıhtı oluşumlarının giderilmeye çalışıldığı, kafa paralizlerinde kafanın yan döndüğü, yem yemede ve su içmede zorluk yaşandığı, tedavide boyun, kanat ve kuyruk tüylerinin makas yardımı ile kesildiği, yolundığı ya da bölgeye jilet yardımı ile kesik atıldığı, kafanın döndüğü yönün aksine doğru çevrildiği ya da çekildiği, ayak felcinin tedavisinde ise kan dolaşımını sağlamak için sadece paça tüylerinin yolundığı tespit edildi. Felcin tedavisinde boyun bölgesine kesik atılmasının, kafanın döndüğü yönün aksine doğru çevrilmesi ya da çekilmesinin, boyun, kanat ve kuyruk tüylerinin kesilmesi ya da yolunmasının hayvan gönenci (refahı) ve haklarına aykırı olan ampirik yöntemler olduğu ileri sürülebilir. Bu bağlamda özellikle güvercin yetiştiricilerinin hayvan gönencine ve haklarına yönelik bilgilendirilmesi ve eğitilmesi gerektiği önerilebilir.

Güvercinlerde siğilin genellikle gaga, göz kenarı ve vücudun diğer yerlerinde mercimek veya nohut büyüklüğünde görüldüğü (Özmen 1981); siğillerin üzerine otomobil atık yağı ile pansuman yapıldığı, bu uygulama birkaç gün devam ettikten sonra siğillerin jilet veya keskin bir alet ile kesildiği, hayvanın kendi kuyruğundan ya da mundar bir hayvanın kuyruğundan bir kıl koparılıp siğile bağlanarak kendiliğinden düşmesi sağlandığı bildirilirken (Yaşar ve ark. 2013); Çalışmada siğil ve kistlerin güvercinlerde genellikle gaga, ayak, parmak ve kloakal bölgede küçük şişlikler olarak görüldüğü, tedavide siğil olan derinin bıçak ile kesildikten sonra bölgeye tentürdiyot sürüldüğü, dolayısıyla siğilin vücutta görüldüğü bölgelerin Özmen'in bulguları ve siğilin kesilmek suretiyle gerçekleştirildiği tedavi şeklinin ise genel olarak Yaşar ve ark.'ın verileri ile uyumlu olduğu söylenebilir.

İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümünde gerçekleştirilen çalışmada (Yaşar ve ark. 2013); mantar hastalığında kabuklar bir taşla kazınıp uzaklaştırıldıktan sonra tereyağı ve şeker karışımının deri iyileşinceye kadar sürüldüğü, tuzlu tereyağı ve

kınının karıştırılarak sürüldüğü, otomobil atık yağı, benzin, sarımsak, tahin, pekmez, sumak, tuz veya buğday ilacının hastalıklı bölgeye sürüldüğü bildirilmiş; Çalışmada ise mantarın genellikle güvercinlerin ayaklarında görüldüğü, tedavide mantarlı bölgeye zeytinyağı sürüldüğü ve mantar hastalığı görülen ayak tırnaklarının uzadıkça kesildiği saptanmıştır. Çalışmada belirlenen zeytinyağı uygulamasının, Yaşar ve ark. (2013)'ün çalışmasında uygulanan tereyağı, otomobil atık yağı, gres yağı gibi yağların uygulanma mantığı ile paralellik gösterdiği ve İç Anadolu Bölgesi folklorik veteriner hekimliğinde mantar tedavisine yönelik yağ kullanımının yaygın bir tedavi şekli olduğu belirtilebilir.

Yüksel (2012) büyükbaş ve küçükbaş hayvanların deri yaralanmalarında katran kullanıldığını; Avcı ve Özen (2016) vücudun çeşitli bölgesinde oluşan yaralarda iyileşmeyi hızlandırmak ve kanamayı durdurmak için temiz bir bez veya pamuk ile bölgeye katran sürüldüğünü; Yaşar ve ark. (2013) derinin açık ve kapalı yaralarında katran kullanıldığını ve katrana aynı zamanda "bise" adı verildiğini ifade etmiştir. Bu çalışmada da yaraların tedavisinde genellikle bölgeye katran sürülmesinin saptanmasının Yüksel, Avcı ve Özen'in çalışması ile, katrana halk arasında "kara sakız" ya da "bise" adı verilmesinin Yaşar ve ark.'ın çalışması ile uyumlu olduğu ileri sürülebilir. Bölgesel olarak halen aynı ifadenin kullanılıyor olması ise geleneksel halk kültürü ile ilişkili olduğu şeklinde yorumlanabilir.

İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümünde gerçekleştirilen bir çalışmada (Yaşar ve ark. 2013) güvercinin ilk yumurtlamadan sonra ikinciyi yumurtlayamadığı, halk arasında bu probleme "yumurta felci" adı verildiği ve kloakasına el ile bastırılarak yumurtanın çıkarılması verilerine benzer olarak çalışmada yumurta sıkışmasının sebep olduğu duruma "yumurta felci" ya da "ayak felci" adı verildiği, abdomenden kloakaya doğru ovmak suretiyle sıkışan yumurtanın çıkarılmaya çalışıldığı tespit edildi. Ayrıca çalışmada Yaşar ve ark.'ın verilerinden farklı olarak bu durumdaki güvercinlerin yaklaşık üç-dört gün şırınga yardımı ile beslendiği, vitamin takviyesi yapıldığı, kloakaya vazelin veya zeytinyağı damlatıldığı, zeytinyağı içirildiği, kan akışını hızlandırmak için paçalarının yolundığı, kloakaya doğru itildikten sonra beliren yumurtanın zarının jilet yardımı ile kesilip yumurtanın çıkarıldığı, her türlü müdahaleye rağmen çıkarılmadığı durumlarda yumurtanın çok dengeli bir şekilde kırılarak kloakadan dışarı alındığı da belirlenen uygulamalar arasındadır. Özellikle kan akışını hızlandırmak için güvercinin paçalarının yolunmasının rasyonellikten uzak, ampirik bir uygulama olduğu ileri sürülebilir.

İç Anadolu Bölgesi Bozlak kültüründe büyükbaş hayvanların sindirim kanalı parazitlerinin hepsine "solucan" ve "kal kurdu" denildiği, göztaşının kurt düşürücü olarak suda eritilmek suretiyle hayvanlara içirildiği, koyun ağılında *Dikloro Dijenol Trikloroethan* (DDT)'in yere dökülerek yakıldığı ve dumanı ile

ağızdaki pirelerin ölmesinin sağlandığı, burundan ve ağızdan turşu suyu ve sirke içirerek sülüklerin uzaklaştırılmasının sağlandığı (Sinmez 2011), *Fasciolosis*'in tedavisinde katran, tuz ve göztaşı karıştırılarak koyunlara aç karnına içirildiği (Yaşar ve ark. 2015), paraziter hastalıklara karşı kireçli bileşikler, hipokloritler, göztaşı gibi çeşitli dezenfektan maddeler ve insektisitler kullanıldığı bildirilirken (Aydın 1984); Çalışmada güvercinlerin iç parazitleri için "kurt", "bağırsak solucanı" ifadelerinin kullanılmasının ve tedavide hayvan sağlığında kullanılan preparatların uygulanmasının Sinmez'in çalışmasına benzer olduğu, iç parazitlerin tedavisinde içme sularına elma sirkesi, ozon, göztaşı katılmasının ise Yaşar ve ark. ile Aydın'ın çalışmasına paralel olduğu belirtilebilir. Ayrıca her iki çalışmadan farklı olarak güvercinleri paraziter hastalıklardan korumak için; kümese yabancı güvercin alınmamasının, eğer alınacak ise ayaklarının ozon ile dezenfekte edilmesinin, parazit olmaması için yuvalıklarda çam pürü tercih edilmesinin oldukça akılcı ve rasyonel metotlara yakın uygulamalar olduğu söylenebilir.

Halk arasında keneye "gene", uyuz hastalığına "kel" (Yüksel 2012), *trichophytosis* hastalığına "kellik" (Sinmez 2011), ayrıca uyuzda hayvanın tüylerinin dökülmüş haline de "kellik" adı verildiği (Yaşar ve ark. 2015) bildirilirken, çalışmada da halk arasında keneye "gene", sadece tüleme zamanı değil, aynı zamanda parazitin sebep olduğu tüy dökümü ile ortaya çıkan çıplaklığa ise "kel olmak" ifadesinin kullanılması; paraziter hastalıklarda kullanılan ifadelerin genel olarak Yüksel, Sinmez, Yaşar ve ark.'ın verileri ile uyumlu olduğu ve Konya ilinde bölgesel folklorik ifadelerin varlığını halen devam ettirdiği şeklinde yorumlanabilir.

Coccidiosis kanatlı yetiştiriciliğinde oldukça önem arz eden bir enfeksiyondur. Hastalığın oluşumunda konak, bakım, besleme, diğer hastalıklar ve stres faktörlerinin etkisi büyük olup, hasta hayvanlarda yeşil renkte dışkı, susuzluk ve iştahsızlık gibi klinik belirtiler görülür (Derinbay Ekici 2017). Çalışmada ise bu hastalıkta yeşil renkte ishal görüldüğünün bildirilmesinin Derinbay Ekici'nin verilerine paralel olduğu söylenebilirken, bu hastalığın hava akımı veya soğukta kalan güvercinlerde meydana geldiğine inanılmasının ise rasyonellikten uzak bir düşünce olduğu ileri sürülebilir.

Dünyanın bir çok yerinde ve Türkiye'de de yaygın olarak görülen *Trichomoniasis* enfeksiyonunda ağız boşluğunda, yumuşak damakta küçük sarımsı (peynirimsi) lezyonlar görülür ve bu lezyonlar zamanla özefagus, kursak, taşlık ve bazen de karaciğere yayılır. Enfeksiyon kaynağı ortadan kaldırılarak, bağışıklığı artırmak için vitamin takviyesi yapılmalıdır (Derinbay Ekici 2017). Derinbay Ekici'nin verilerine benzer şekilde, çalışmada da peynirimsi lezyonlara "peynirleşme", "kursak mantarı", "sarı yara", "pamuk", "içi çiçek" ya da "ağız yolu iltihabı" gibi isimler verildiği; bu enfeksiyonda ağız ve boğazda peynirleşme, yem yiyememe, zayıflama, yüksek ateş, su tüketiminde artış ve kursak şişmesi gibi klinik semptomlar görüldüğü

bildirilirken; tedavide içme sularına kırmızı kil katılması, sirke veya sarımsak verilmesi, balık yağı içirilmesi, sarımsaklı turşu suyu ve veteriner preparatları kullanılmasının rasyonel uygulamalar olduğu ileri sürülebilir. Tedavide kulak çöpü ya da kuyruk tüyü yardımı ile peynirleşme odaklarına mürekkep, betadin veya viks sürülmesi, bu hastalığa yakalanan balon güvercinlerinin bir pet şişenin içerisine dik konumda yerleştirilerek yaklaşık bir gün süresince bekletilmesi, kursak şişliğini tedavi etmek için, kursağın delinerek içi boşaltıldıktan sonra dikilmesi gibi yöntemlerin ise rasyonellikten uzak olduğu söylenebilir.

Tip 1 Adenovirus enfeksiyonu genellikle bir yaşın altındaki ve en çok da üç-beş aylık güvercinlerde görülürken, *Tip 2* olanı 10 günlükten altı yaşa kadar olan güvercinlerde görülür. Etkilenen güvercinler acı çekerler ve ayrıca kusma, akut sulu ishal ve kilo kaybı gibi semptomlar gözlenir. Bu enfeksiyon çok hızlı yayılım gösterir ve kısa zamanda barınaktaki tüm hayvanlara bulaşabilir. Komplike olmayan vakalarda iki haftada klinik iyileşme gözlenebilirken, komplike vakalardaki iyileşme ise birkaç haftadan birkaç aya kadar uzayabilir (Avcı 2017). Çalışmada bu hastalıkta ateş, halsizlik, ishal, yem yememe, zayıflık, su tüketiminde artış gibi klinik semptomlar olduğu, genellikle mugluf döneminde görüldüğü bilgilerinin Avcı'nın verileri ile uyumlu olduğu, hastalığın güvercinin tüy dökümüne gireceği ya da tüy dökümünden çıkamadığı (Resim 2) zamanlarda ve yavrunun iyi beslenemeyip soğukta kaldığı durumlarda görüldüğüne inanılmasının bu hastalığın genel olarak bağışıklık sisteminin düşük ve stres seviyesinin yüksek olduğu dönemlerde görüldüğü şeklinde yorumlanabilir. Tedavide kursak içeriğinin boşaltılarak vitamin içirilmesinin, mugluf dönemi tüylerini atabilmesi için bel üstü tüylerinin yolunmakla birlikte etkin bir tedavi şeklinin olmadığı ifade edilmesinin ise Konya ili folklorik veteriner hekimliğinde, gözleme dayalı ve akılcı yöntemlerin kullanıldığının bir göstergesi olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

Türkiye'de *Newcastle* hastalığının kanatlılarda önemli bir sorun olmaya devam ettiği ve hastalığın yayılmasında yabancı güvercinlerin büyük tehdit oluşturduğu (Dakman ve ark. 2008); Konya'da halk arasında *Newcastle* hastalığına "veba" dendiği, vebaya yakalanan güvercinlerin ishal olup zayıfladıkları ve 10-15 gün içinde öldükleri belirtilirken (Özmen 1981); Çalışmada da bu hastalığa halk arasında "veba", "ület" ya da "karan" adı verilmesi, veba hastalığının görülmesine ise "karan geldi" ya da "veba kavgını" denilmesi ve tedavisinin mümkün olmadığını bildirilmesinin, Özmen'in verileri ile genel olarak uyumluluk gösterdiği ve yetiştiricilerin gözlem yeteneğinin güçlü olduğu sonucuna varılabilir. Ayrıca, kış aylarında güvercin gübresinin kümeste nem yaptığı için vebaya sebep olduğuna ve peynirleşme hastalığının vebaya çevirdiğine inanılmasının, araştırılmaya muhtaç konular olduğu belirtilebilir.

Paramyxovirus 1 enfeksiyonları genellikle her mevsim görülebilirse de bakım ve besleme durumlarının iyi olmadığı, hijyen koşullarına dikkat edilmeyen, koruyucu önlemlerin alınmadığı, stres faktörlerinin yüksek olduğu barınaklarda, özellikle kış aylarında görülme ihtimali artar. Hastalığın belirtileri arasında; sulu ve kanlı ishal, solunum sistemi rahatsızlıkları ve boyunda tremor, tortikollis, paralizisi, denge kayıpları gibi sinir sistemi rahatsızlıkları yer alır. Ayrıca bu hastalıkta bildirilen spesifik bir tedavi protokolü bulunmamaktadır (Avcı 2017). Çalışmada bu enfeksiyona “kafa dönmesi”, “titrek felci”, “titrek baş” ya da “sallabaş” adı verildiği (Resim 3) ve bu hastalıkta kafada titreme, kafayı dik tutamama, boyunda kısmi ya da tam paraliz ve tortikollis görüldüğü, kafanın ters döndüğü veya yana doğru kaydığı bilgilerinin Avcı'nın verileri ile paralellik gösterdiği söylenebilir. Hastalığın genellikle sıcak olan kümeslerde yüksek ateşten dolayı, veba geçiren güvercinlerde iyileştikten sonra ya da güvercinlerde gerçekleşen herhangi bir paralizisi sonrasında ortaya çıktığına inanıldığı, tedavisinde kan dolaşımını hızlandırmak için kafadan başlayarak boyun, kanat ve kuyruk tüylerinin yolunduktan sonra güvercinin karanlık bir yerde dinlendirildiği, güvercinin heyecanını gidermek amacıyla soğuk su ile şok uygulandığı, pis kanı uzaklaştırmak için kuyruk tüyünün burun içine batırılarak kan aktıldığı, ensede belirgin olarak bulunduğu ifade edilen siyah noktadan tüyler çekilip o bölgeye jilet ile kesik atıldıktan sonra hasta güvercinin izole ve karanlık bir ortamda dinlendirildiği bilgilerinin rasyonellikten uzak uygulamalar olduğu söylenebilir. Tedavi için en az iki aylık bir zamana ihtiyaç duyulduğu ancak çoğu zaman tedaviye cevap alınamadığı, iyileşme görülsede dahi bu hastalığın güvercinlerde kalıcı hasar bıraktığının bildirilmesinin ise yine Avcı'nın verileri ile uyumlu olduğu ileri sürülebilir.

Poxvirus enfeksiyonları ağız ve göz çevresinde, derinin tüysüz bölgelerinde siğil benzeri kabarcıklar, ağız, dil, farenks ve larenkste difterik membranlar şeklinde oluşumlar ile görülebilirken, çok bulaşıcı ve bazen de öldürücü olabilmektedir. Ayrıca uygulanmakta olan spesifik bir tedavi şekli de bulunmamaktadır. Gelişen lezyonlar kabuk oluşumunu hızlandırmak için iyot ile boyanabilir (Avcı 2017). Çalışmada *poxvirus* enfeksiyonuna “çiçek” ya da “dış çiçek” adı verildiği, gözde şişme ve sulanma, gaga, göz kenarları, ağız çevresi ve vücudun diğer tüysüz bölgelerinde siğil benzeri oluşumlar görüldüğü, lezyonlar ağız bölgesinde görüldüğü takdirde “ağız çiçeklenmiş” ifadesinin kullanıldığı, bulaşıcı olması sebebiyle hasta güvercinlerin izole edildiği bilgilerinin genel olarak Avcı'nın bilgileri ile uyumlu olduğu ifade edilebilir. Avcı'nın verilerine benzer olarak çalışmada kulak çöpü yardımıyla ayakkabı boyası veya mürekkebin çiçek lezyonlarının olduğu bölgelere sürülmesinin, gelişen lezyonların kabuk oluşumunu hızlandırmak için iyotun kullanım amacı ile benzer olabileceği ancak bu hastalığın dişi ve erkek olmak üzere iki formu bulunduğu ve dişisinin tehlikeli, erkekinin ise iyi

huyulu olduğuna inanılmasının rasyonellikten uzak, inanış temelli bir yaklaşım olduğu sonucuna varılabilir. Tedavide göztaşı ve vazelin karışımının, lezyonların görüldüğü bölgelere sürülmesinin, içme sularına ve banyo sularına göztaşı, ozon veya sirke eklenmesinin, çiçek lezyonları kesildikten sonra bölgenin dağlanmasının, lezyonların bulunduğu bölgelere ısı uygulanmasının ve kanatıldıktan sonra göztaşı basılmasının ise sekonder enfeksiyonları ve bulaşmayı önleyici akılcı uygulamalar olduğu söylenebilir. Üst solunum yolu rahatsızlıkları ile ilişkili detaylı bilgi verilmemesi ve sadece “üst solunum rahatsızlığı” adı verilen bir hastalıktan bahsedilmesi, yetiştiricilerin bu konuya ilişkin bilgi birikimlerinin zayıf olduğu ya da bahsi geçen rahatsızlıklara yönelik ayırt edici tanılarının bulunmadığı şeklinde yorumlanabilir. Sonuç olarak, yetiştiricilerin güvercin hastalıkları konusunda uzmanlaşmış veteriner hekime ihtiyaç duydukları; geleneksel tedavi yöntemleri arasında göztaşı, ozon gibi uygulamaların bilimsel veriler ile genel olarak uyumlu ve rasyonel olduğu, ancak folklorik veteriner hekimliğinde yer etmiş olan tüylerin yolunması, derinin jilet ile kesilmesi gibi halk kültüründe mevcut, hayvan gönencine ve haklarına aykırı bir takım ampirik yöntemlerin de halen varlığını devam ettirdiği; güvercin hastalıkları ve tedavileri konusunda veteriner hekimliği açısından araştırılmaya muhtaç alanlar olduğu söylenebilir.

Açıklama: Bu çalışma, 02-04 Aralık 2020 tarihlerinde düzenlenen “14. Uluslararası Türk Kültürü, Sanatı ve Kültürel Mirası Koruma Sempozyumu/Sanat Etkinlikleri”nde sunulan “Konya İli Folklorunda Güvercin” adlı sözlü bildirinin “Hastalıklar” kısmı genişletilerek hazırlandı.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK)'nin 11.06.2020 tarih ve 2020/56 sayılı onayı ile yürütüldü.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alptekin M.** Meddah Behçet Mahir'in halk anlatılarında halk hekimliği ve baytarlığı. Gaziantep University Journal of Social Sciences. 2018; 17(3): 879-893.
- Arslan ES.** Ege Bölgesi folklorunda veteriner hekimliği ve hayvancılık üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, AÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998.
- Avcı A, Özen R.** “Kara hekim: Katran”ın Antalya veteriner hekimliği folklorunda hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanımı. FÜ Sağ. Bil. Vet. Derg. 2016; 30(1):39-44.
- Avcı O.** Güvercinlerin Viral Enfeksiyonları, In: Güvercin El Kitabı, Ed; Işık N, Er A, Güneş Tıp Kitabevleri, Ayrıntı Basım Yayın ve Matbaacılık, Ankara. 2017; s. 99-119.
- Aydın N.** Bölge tavukçuluğunu etkileyen hastalık sorunları ve alınması gerekli hijyenik önlemler. Selçuk Üniversitesi Vet.

Dakman A, Güleç M, Günaydın E, Coşar M. Evcil ve yabani kanatlılardan izole edilen Newcastle Hastalığı viruslarının patotiplendirilmesi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Derg. 2008; 19(1):19-26.

Derinbay Ekici Ö. Protozoon Hastalıkları ve Tedavisi, In: Güvercin El Kitabı, Ed; Işık N, Er A, Güneş Tıp Kitabevleri, Ayrıntı Basım Yayın ve Matbaacılık, Ankara. 2017; s. 87-99.

Dinçer F. Türk folklorunda veteriner hekimliği üzerine araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 1967.

Özmen M. Konya'da güvercincilik. Selçuk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Derg. 1981; 1:157-187.

Sever M. Türk halk inançlarında ve halk hekimliği uygulamalarında meyve. Türklük Bilimi Araştırmaları. 2004; 16:95-109.

Sinmez ÇÇ. Bozlak kültüründe folklorik veteriner hekimliği ve hayvancılık üzerine araştırma. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2011.

Sinmez ÇÇ, Aslım G. Aksaray Malaklısı çoban köpeklerinin hastalıklarının tedavisinde kullanılan halk veteriner hekimliği

Sinmez ÇÇ, Aslım G, Yaşar A. An ethnoveterinary study on plants used in the treatment of dermatological diseases in Central Anatolia, Turkey. Journal of Complementary Medicine Research. 2018; 8(2):71-84.

Şar S. Anadolu'da halk hekimliği uygulamaları. Türkiye Klinikleri Tıp Etiği-Hukuku-Tarihi Derg. 2005; 13(2):131-136.

Yaşar A, Sinmez ÇÇ, Aslım G. İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümünde (Aksaray, Karaman ve Konya) folklorik veteriner hekimliği ve hayvancılık üzerine araştırma. TÜBİTAK Projesi Kapatma Raporu, TOVAG-112O428, 2013; s. XI, 147.

Yaşar A, Sinmez ÇÇ, Aslım G. İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümü folklorunda ruminantların paraziter hastalıkları ve tedavi yöntemleri. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2015; 21(1): 1-7.

Yılmaz O, Boz MA. Türkiye'de amatör güvercin yetiştiriciliğinin durumu ve kullanılan yöresel tip sınıflandırmaları. Akademik Ziraat Derg. 2012; 1(1):45-60.

Yüksel E. Aşağı Fırat Havzasında veteriner hekimliği folkloru üzerine araştırmalar. Yayımlanmamış Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 2012.

KAYNAK KİŞİ LİSTESİ

Sıra	Adı Soyadı	Doğum Yılı	Eğitim Seviyesi	Mesleği	İlçe/İl	Görüşme Tarihi
K1	Ümit Çökmen	1979	Ortaokul	Antrenör	Karatay/Konya	16.07.2020
K2	Mehmet Ertekin	1974	İlkokul	Serbest Meslek	Karatay/Konya	16.07.2020
K3	Abdi Büyükağaçcı	1936	İlkokul	Selçuklu Güvercin Severler Dern. Bşk.	Meram/Konya	11.07.2020
K4	İsa Güner	1972	İlkokul	Serbest Meslek	Meram/Konya	11.07.2020
K5	Mehmet Nergis	1977	Üniversite	Serbest Muhasebeci	Meram/Konya	11.07.2020
K6	Ünsal Doruk	1963	Yüksekokul	İcra Şefi	Meram/Konya	11.07.2020
K7	Yusuf Aladağlı	1967	Ortaokul	Emekli	Meram/Konya	11.07.2020
K8	Seyit Mehmet Gürler	1991	İlkokul	Serbest Meslek	Meram/Konya	22.07.2020
K9	Mehmet Yıldırım	1968	İlkokul	Meram Güvercin Severler Dern. Bşk.	Meram/Konya	23.07.2020
K10	Abdurrahman Albayrak	1990	Önlisans	Sekreter	Meram/Konya	23.07.2020
K11	Abdullah Karabacak	1987	Lise	Serbest Meslek	Meram/Konya	23.07.2020
K12	Adem Albayrak	1966	Önlisans	Elektrik Teknisyeni	Meram/Konya	25.07.2020
K13	İsmail Evciler	1966	Lise	Emekli	Meram/Konya	25.07.2020
K14	Adem Kılınç	1990	Üniversite	TSK Personeli	Meram/Konya	01.08.2020
K15	Ahmet Türkoğlu	1988	Lise	TSK Personeli	Meram/Konya	07.08.2020
K16	Erdoğan Tosun	1966	Lise	Lokantacı	Meram/Konya	07.08.2020
K17	Muzaffer Türkoğlu	1980	Lise	Sigortacı	Meram/Konya	07.08.2020
K18	Oğuzhan Tosun	1989	Üniversite	Veteriner Hekim	Meram/Konya	07.08.2020
K19	Selahattin Çetin	1968	İlkokul	Kaynakçı	Meram/Konya	07.08.2020
K20	Şükrü Sarı	1968	İlkokul	Emekli	Selçuklu/Konya	28.07.2020
K21	Zekeriya Şen	1969	İlkokul	Doğalgaz Tesisatçısı	Selçuklu/Konya	28.07.2020
K22	Burhanettin Görmez	1960	Ortaokul	Emekli	Selçuklu/Konya	07.08.2020
K23	Seyit Selek	1981	İlkokul	Kalıpcı	Selçuklu/Konya	08.08.2020
K24	Ufuk Eken	1993	Ortaokul	Yedek Parçacı	Selçuklu/Konya	08.08.2020
K25	İbrahim İrioğlu	1993	Ortaokul	Operatör	Selçuklu/Konya	08.08.2020
K26	Mustafa Koyuncu	1945	Ortaokul	Emekli	Selçuklu/Konya	08.08.2020
K27	Nihat Uzun	1954	Üniversite	Yüksek Tekniker	Selçuklu/Konya	14.08.2020
K28	Ahmet Tür	1959	Ortaokul	Emekli Şoför	Selçuklu/Konya	14.08.2020

Sonnot

1 K1
2 K1
3 K1,5,8-14
4 K23-26
5 K1,5,8-14,27-28
6 K1,5,8,12-19,23-28
7 K5
8 K1,4-5,12-13,15-17,19-21,23-25,27-28
9 K1
10 K4-5
11 K12-13
12 K14,27-28
13 K15-17,19-21,23-25
14 K15-17,19
15 K27-28
16 K20
17 K1,11,14-17,19-21,23-28
18 K12-17,19,27-28
19 K25
20 K12-14
21 K15-17,19
22 K27-28
23 K27
24 K2,4-5,9-11
25 K1,4-5,9-17,19-21,23-28
26 K23-26
27 K25
28 K27-28
29 K20
30 K9-11
31 K27-28
32 K9-11
33 K14,23-28
34 K27-28
35 K23-26
36 K23-28
37 K20
38 K20-21,23-26
39 K23-26
40 K23,25
41 K20-21,23-25
42 K23,25
43 K27-28
44 K4-5,15-17,19
45 K15-17,19
46 K20-21
47 K20-21
48 K15-17,19
49 K1
50 K1,24
51 K1,4-5,19,23-26
52 K1,13
53 K12-13
54 K1,4-5,8-17,19-21,23-28
55 K1,9-13,20-21,27-28
56 K8-13,23-28
57 K27-28
58 K1,6,8,12-17,19-28
59 K1,9-11
60 K1
61 K8,14,26-28
62 K15-17,19
63 K27
64 K20-21,23-28
65 K23-26
66 K12-14
67 K9-11,14
68 K9-11
69 K1,27-28
70 K1,4-5,8-17,19-28
71 K11
72 K1,16-17,19
73 K4,5
74 K12-13
75 K9-11
76 K14
77 K1,4-5,8-17,19-21,23-28
78 K15-17,K19
79 K1,4-5,8-17,19-21,23-28
80 K1,20-21,23-28
81 K1,23-26
82 K4-5,9-11,15-17,19,26-28
83 K4-5
84 K20-21
85 K24
86 K4,14
87 K20
88 K23-26
89 K8
90 K5,9-11,14,27-28
91 K14
92 K9-13
93 K15-17,19-21
94 K15-17,19
95 K20
96 K26-28
97 K26,28
98 K27-28
99 K9-11
100 K11
101 K27-28
102 K27-28
103 K14
104 K14,27-28
105 K23-26

106 K14
107 K27-28
108 K1,4,7-8,14,21
109 K9-11
110 K10-11,23-28
111 K27-28
112 K4-5,11,25-28
113 K12-14
114 K4
115 K20-21
116 K24-25
117 K25
118 K8,12-13
119 K23-26
120 K12-13,23-26
121 K9-11,23-28
122 K12-13,23-26
123 K23-26
124 K20
125 K15-17,19,27-28
126 K1
127 K14-17,19-21,27-28
128 K27-28
129 K12-13,21,23-28
130 K8
131 K20-21,23-26
132 K20,23-26
133 K23,26
134 K9,11
135 K11
136 K1,4-5,9-17,19-28
137 K1,4-5,9-17,19-28
138 K20-21
139 K27-28
140 K3
141 K9-11,22
142 K1-2,8-17,19-21,23-28
143 K14
144 K1,8-17,19-21,23-28
145 K9-11,27-28
146 K27-28
147 K1,9-13,15-17,19,27-28
148 K15-17,19
149 K9-13,27-28
150 K14
151 K9-13
152 K8,12-13,15-17,19-21
153 K23-28
154 K12
155 K1,8-17,19-21,23-28
156 K4-5
157 K20-21
158 K8
159 K27-28
160 K8
161 K12-13,25-26
162 K14
163 K14
164 K20-21
165 K27

Effects of Age on The Concentrations of Plasma Cytokines and Lipid Peroxidation in Sheep

Mehmet Naci SALİM¹, İbrahim DURMUŞ², Mehmet BAŞEĞMEZ³, İsmail KÜÇÜKKURT⁴,
Abdullah ERYAVUZ^{5*}

¹Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Research and application farm, TR-03200 Afyonkarahisar, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Şubat Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 03100, Afyonkarahisar, Turkey

³Pamukkale University, Acıpayam Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, 20100, Denizli, Turkey

⁴Afyon Kocatepe University, Veterinary Faculty, Department of Biochemistry, TR-03200 Afyonkarahisar, Turkey

⁵Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effects of age on blood cytokine levels and lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) levels and thyroid hormones levels in sheep of different ages. Female sheep of lamb (4-6 months), young (12-18 months) and adult (36-40 months) from a herd in same care and feeding conditions were used in the study. Blood samples were taken before morning feeding from 30 sheep in total, 10 heads from each age group. MDA, glutathione (GSH), interleukin-1 (IL-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and T3 and T4 levels were determined in blood samples. Young animals have significantly higher MDA and lower IL-6 levels than lambs. There was no difference between age groups in terms of GSH, IL-1 β , TNF- α , T3 and T4 levels. As a result, age has an effect on blood lipid peroxidation and IL-6 levels in sheep.

Key words: Age, sheep, cytokines, lipid peroxidation, thyroid hormones.

Koyunlarda Plazma Sitokin ve Lipid Peroksidasyon Düzeylerine Yaşın Etkisi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, değişik yaşlardaki koyunlarda kan sitokin düzeyleri ve lipid peroksidasyon ürünü malondialdehid (MDA) seviyesi ile tiroid hormonları düzeylerine yaşın etkilerinin belirlenmesidir. Çalışmada, aynı bakım ve besleme şartlarındaki bir sürüden kuzu (4-6 aylık, kuzu), genç (12-18 aylık) ve ergin (36-40 aylık) dişi koyun kullanıldı. Her bir yaş grubundan 10 baş olmak üzere toplam 30 koyundan sabah yemlemesinden önce kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde MDA, glutatyon (GSH), interlökin-1 beta (IL-1 β), tümör nekrozis faktör alfa (TNF- α) ve interlökin-6 (IL-6) ile T3 ve T4 düzeyleri belirlendi. Genç koyunların kuzularınkinden önemli oranda daha yüksek plazma MDA ve daha düşük IL-6 düzeylerine sahip oldukları bulundu. GSH, IL-1 β , TNF- α , T3 ve T4 düzeyleri bakımından yaş grupları arasında farkın olmadığı saptandı. Sonuç olarak, koyunlarda kan lipid peroksidasyonu ve IL-6 düzeylerine yaşın etkisi olduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Yaş, koyun, sitokinler, lipid peroksidasyonu, tiroid hormonları.

To cite this article: Salim M. N. Durmuş İ. Başeğmez M. Küçük Kurt İ. Eryavuz A. Effects of Age on The Concentrations of Plasma Cytokines and Lipid Peroxidation in Sheep. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):37-44.

Submission: 22.09.2020 Accepted: 05.01.2021 Published Online: 09.02.2021

ORCID ID; MINS: 0000-0002-4805-576X; İD: 0000-0003-1360-8843; MB: 0000-0002-9994-1251; İK: 0000-0003-0198-629X; AE: 0000-0001-8602-2400

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

GİRİŞ

Yaşlanma, fiziksel özelliklerdeki değişiklikler ve birçok fizyolojik fonksiyonun azalmasıyla ilişkili olup, tüm organizmalarda genetik, hücre, doku ve sistem seviyelerinde de zararlı değişikliklere neden olmaktadır. Yaşlanmaya bağlı bu değişikliklerin temel mekanizmaları tam olarak anlaşılmamıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, bu farklı değişiklikleri açıklayabilecek temel fizyolojik mekanizmaları belirlemeye çalışmaktadır.

Sığır ve koyun gibi ruminant hayvanların verim kabiliyetleri (örn., et, süt, yavru vs.) ile yaş arasında sıkı bir ilişki bulunması nedeniyle, ekonomik değerleri de yaşa göre değişmektedir (Şeker ve ark., 2017, Kandemir ve ark., 2019). Koyunlarda yaş tayini, alt çenede bulunan süt kesici dişlerinin düşerek yerine daimi dişlerin gelmesine bakarak belirlenebilmekte ve dişlerin değişiminde ırk, beslenme ve hayvanın durumu da etkili olabilmektedir. Dişlerin değişimine göre; erken gelişen, geç gelişen ve normal gelişen olmak üzere üç bölümde koyunların ırk ayırımı yapılabilmektedir. Ortalama maksimum ömrün 12 yıl olduğu koyunların, 7 ve 8 yaşına geldiklerinde diş yapılarının iyice bozulduğu, dökülmeye başladığı ve koyunların yaşlandığı ifade edilmektedir (Akçapınar, 1994). Koyunlarda dişlerin durumu yaşa bağlı olarak değiştiği için, yaşları ilerledikçe diş yapıları bozulmakta ve merada yedikleri yemleri gereği gibi değerlendirememektedirler. Bu da verimlerinin azalmasına yol açmaktadır.

Koyunculukta doğumdan sonra 6 aylık olana kadar kuzu, 6-12 aylık olanlara toklu, 1 yaşından 2 yaşına kadar dişilere şişek ve 2 yaşından büyük olan dişilere ise koyun adı verilmektedir (Şeker ve ark., 2017). Koyunlar kuzu, şişek ve erişkin dönemlerinde yaşadıkları fizyolojik değişikliklere (puberta, gebelik, doğum, laktasyon gibi) bağlı olarak kan metabolitlerinde de değişimler meydana gelmektedir (Antunović ve ark., 2011). Bu değişiklikler bağışıklık sisteminde de kendini göstermekte ve hayvanların enfeksiyonlara karşı dirençlerini ortaya koymaktadır (Craig ve ark., 2014, Fernández ve ark., 2016). Nitekim, kuzuların bünyelerinde hastalıklara karşı koyacak bağışık maddeleri (IgG) yaklaşık 2 haftalık olduğunda üretmeye başladıkları ve 3-4 aylık yaşa kadar yeterli seviyede üretebilme kabiliyetine ulaştıkları bilinmektedir (Şeker ve ark., 2017). Bu nedenle kuzular doğar doğmaz alacakları kolostrumdan sağladıkları pasif bağışıklık sayesinde 3-4 aylık yaşa kadar hastalıklardan korunmaktadır (Foster ve Hileman, 2015). Genç kuzularda, gastrointestinal parazitlere karşı etkili ve koruyucu bağışıklık üretmedeki yetersizlik, 6 aylıktan küçük kuzuların helmintlere maruz kaldıktan sonra bağışıklık geliştiremediği, buna karşın, aynı maruz kalmanın yaşlı koyunlarda koruyucu bağışıklık tepkileri ile sonuçlandığı bir dizi çalışma ile gösterilmiştir (Dobson ve ark., 1990, Craig ve ark., 2014).

Organizmanın en önemli koruyucu fizyolojik sistemi olan bağışıklık sistemi, diğer sistemlerle birçok bağlantısı bulunmakta ve sinir sistemi-endokrin sistem-bağışıklık sistemi ekseninin bir parçası olarak kabul edilmektedir (Fulop ve ark., 2018). Vücuttaki homeostazın korunmasına karşı en belirgin zorluklardan birini enfeksiyon oluşturmaktadır. Bir enfeksiyon sırasında organizmalar, hayatta kalmak için kaynaklarını; üreme, büyüme ve metabolizma gibi faaliyetlerden çeşitli fizyolojik ve davranışsal tepkilere yönlendirmek zorunda kalmaktadır. Bu mücadelenin düzenleyicisi olan nöroendokrin sistem, üreme gibi faaliyetlerin askıya alınmasıyla ilgili vücudun bağışıklık stresine yanıtında önemli bir rol oynamakta ve enfeksiyonla mücadelenin güç kazanmasını sağlamaktadır (Pollak ve Yirmiye, 2002). Yaşa bağlı olarak çeşitli immünolojik parametrelerin değiştiği, bunun da bağışıklık yetmezliğine ve mikrobiyal enfeksiyon sonrası yaşlılarda morbidite ve mortalitede bir artışa yol açtığı ifade edilmektedir (Westendorp, 2004, Yalçın ve ark., 2011, Suchard, 2015, Pawalec, 2018). Yaşlanmayla birlikte meydana gelen bu değişikliklere; bağışıklık sistemi içinde ve çeşitli başka fizyolojik (bağışıklık olmayan) süreçlerde yer alan önemli moleküllerden sitokinlerin üretimindeki değişiklikler de katılmakta ve yaşa bağlı olarak kan sitokin düzeyleri yükselmektedir (Stowe ve ark. 2010, Huang ve ark., 2011, Suchard, 2015, Pawalec, 2018). Yaşa bağlı olarak bağışıklık sisteminin işlevini aşamalı olarak bozulması "İmmünoşenesans" olarak tanımlanmakta ve yaşın ilerlemesiyle birlikte bağışıklık sisteminde meydana gelen değişiklikleri ifade etmektedir (Yalçın ve ark., 2011, Pawalec, 2018). Bu nedenle, ruminant hayvanlarda yaşa bağlı sitokin biyolojisindeki değişikliklerin belirlenmesi, bu hayvanlarda yaşlanmanın hastalık direncini ve genel sağlığı etkileyen bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerine yönelik değerli veriler sağlayabilir. Nitekim, sitokinlerin ruminant hayvanların hastalıklarının teşhisinde kullanılmasının, etkili bir teşhis yöntemi sunabileceği (Scheerlinck ve Yen 2005), koyunlarda ise proenflamatuar sitokinlerin kan seviyelerindeki değişikliklerin izlenmesinin, enfeksiyon ve enflamasyon sırasında değerli teşhis ve prognostik bilgi sağlayabileceği ifade edilmektedir (Kumar ve ark., 2010). Memelilerde daha önce yapılan çalışmalarda sitokin üretimine yaşın etkisinin olduğu yönündeki bildirimler (Stowe ve /ark., 2010, Yalçın ve ark., 2011, Fulop ve ark., 2018, Pawalec, 2018) bulunmasına rağmen, ruminant hayvanlarda yapılan çalışmalar arasında yaşın sitokin üretimi ve düzenlenmesine etkileriyle ilgili yeterli bilgi bulunmamaktadır. Ruminant hayvanlarda proenflamatuar sitokinlerin yaşa bağlı değişimlerine yönelik anlayışımızı geliştirmek için bu çalışmada; farklı yaşlardaki koyunların kanındaki proenflamatuar sitokin düzeyleri ile bu düzeylerde etkisi olabilecek oksidatif stres parametrelerinin belirlenmesi amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada; Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKÜHADYEK – 112-18 referans nolu 49533702/163 sayılı araştırma) onay alındıktan sonra, Afyonkarahisar ili Bayat ilçesinde bulunan bir özel sektöre ait çiftlikteki farklı yaşlardaki Merinos ırkı koyun sürüsünde bulunan koyunlardan 30 baş koyun kullanılmıştır. Hayvanların aynı ortam ve barınma şartları ve sürüde bulunan hayvan sayısı göz önüne alınarak, 6 aylık (4-6 aylık, kuzu) 10 baş, 1 yaş üzeri (12-18 aylık, şişek) 10 baş ve 3 yaş üzeri (36-40 aylık, ergin koyun) 10 baş toplam 30 dişi koyunlardan (Şeker ve ark., 2017) sabah yemlemesinden önce antikoagulanlı tüplere kan alınmıştır. Alınan kanların 3000 rpm/dk devirde 10 dakika santrifüj işlemi yapıldıktan sonra elde edilen plazmalardan lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA ve hücre içi bir antioksidan olan GSH düzeyleri analiz edildikten sonraki kalan kısım diğer analizler yapılana kadar -20 °C de derin dondurucuda saklanmıştır.

Kan örneklerinde lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA düzeyleri Draper ve Hadley'in (1990) çift kaynatma yöntemi kullanılarak 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Kan örneklerinde GSH düzeyleri; 5-5'-ditiyobis [2-nitrobenzoik asit] [DTNB:3-karboksi-4-nitrofenil disülfid: Elman Ayracı] sülfidril bileşikleri ile tepkimeye girdiğinde bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks yapı oluşturur. Bu sarı bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak tespit edildi (Beutler ve ark., 1963). Derin dondurucuda saklanan plazmaların çözdürülmesinden sonra IL-1 β , TNF- α ve IL-6

düzeyleri ile T3 ve T4 düzeyleri ticari kitler (SUNRED, Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd., Çin) kullanılarak, üretici firmanın katoloğunda önerdiği gibi, ELİSA cihazında belirlendi.

Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 22,0 istatistik paket programında tek yönlü ANOVA testi uygulanarak yapıldı. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulandı, veriler "ortalama \pm standart hata" olarak ifade edildi. İstatistiksel anlamlılık için $p < 0.05$ kabul edildi.

BULGULAR

Değişik yaş grubuna sahip koyunların plazma GSH, lipid peroksidasyonu ve sitokin düzeylerine yönelik veriler Tablo 1'de verilmiştir. Genç (şişek) hayvanların, kuzularınkinden önemli oranda daha yüksek ($p < 0.05$), lipid peroksidasyonu göstergelerinden MDA düzeylerine sahip olduğu, GSH düzeyleri bakımından ise yaş grupları arasında önemli bir farklılığın ($p > 0.05$) olmadığı tespit edildi (Tablo 1). Farklı yaşlardaki koyunlardaki sitokinlere yönelik elde edilen veriler değerlendirildiğinde, şişek koyunların plazma IL-6 düzeylerinin kuzularınkinden göre önemli olmak üzere ($p < 0.05$), diğer yaş grubu hayvanlardan düşük olduğu gözlemlendi (Tablo 1). Plazma IL-1 β , TNF- α , T3 ve T4 düzeyleri bakımından incelenen yaş grupları arasında istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığı bulundu (Tablo 1).

Tablo 1: Koyunlarda plazma GSH, lipid peroksidasyonu ve sitokin düzeylerine yaşın etkisi (n=10, Ort \pm SH).

Table 1: The affects of age on plasma GSH, lipid peroxidation and cytokines in sheep (n=10, mean \pm SH).

Parametreler	Kuzu	Genç Koyun	Ergin Koyun
GSH (mg/dl)	0.085 \pm 0.0064	0.099 \pm 0.0068	0.085 \pm 0.0089
MDA (μ mol/L)	0.078 \pm 0.001 ^b	0.086 \pm 0.002 ^a	0.085 \pm 0.002 ^{ab}
IL-1 β (pg/ml)	1.247 \pm 0.074	1.572 \pm 0.175	1.393 \pm 0.242
IL-6 (pg/ml)	1.149 \pm 0.172 ^a	0.652 \pm 0.101 ^b	1.029 \pm 0.195 ^{ab}
TNF- α (pg/ml)	1.118 \pm 0.054	1.179 \pm 0.140	1.053 \pm 0.177
T3 (μ g/L)	1.691 \pm 0.070	2.066 \pm 0.175	1.638 \pm 0.259
T4 (μ g/L)	0.892 \pm 0.040	1.068 \pm 0.098	0.883 \pm 0.149

a,b: Aynı satırda farklı harfleri taşıyan değerler istatistiksel olarak önemlidir ($p < 0.05$). GSH: Glutasyon, MDA: Malondialdehit, IL-1 β : Interleukin 1 Beta, IL-6: Interleukin 6, TNF- α : Tümör Nekrozis Faktör Alfa.

TARTIŞMA

Koyunlarda yaşlanmanın biyolojik etkilerinin anlaşılmasına katkı sağlamak ve ruminant hayvanlarda

bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi için alınacak tedbirlere yönelik yeni deliller sunmak için yapılan bu çalışmada; kuzu, genç (şişek) ve ergin olmak üzere farklı yaş grubu koyunlardan alınan kan örneklerinde proenflamatuvar sitokinler ile GSH, MDA ve tiroid

hormonlarının düzeyleri belirlenmiştir. Çalışmada, farklı yaşlardaki koyunlarda bağışıklığın düzenlenmesinde önemli aracı moleküllerden olan proenflamatuar sitokin düzeylerindeki değişimleri incelemek için, aynı bakım ve besleme şartlarına sahip bir sürüdeki kuzu, şişek ve erişkin dönemdeki koyunlardan kan örnekleri alınmıştır. Koyunlarda ileri yaşın 7 ve 8. yaşlarda görüldüğü bildirimi (Akçapınar, 1994) dikkate alınır, çalışmada kullanılan koyunların yaşamın ilk evrelerinde oldukları ve immünoşenesansın görüleceği yaşlarda olmadıkları görülmektedir.

Oksidatif stres; lipitler, proteinler ve DNA gibi önemli hücrel bileşenlerin oksidasyonu nedeniyle, hücre hasarına ve ardından hücre ölümüne neden olabilmektedir (Gilgun-Sherki ve ark., 2001). Oksidatif stres, vücutta reaktif oksijen türlerinin (ROT) üretimi, vücudun onları nötralize etme ve ortadan kaldırma yeteneğini aştığında ortaya çıkmaktadır. Vücut dokularının bu strese duyarlılığı, oksidatif stres derecesi ile antioksidan kapasite arasındaki genel dengenin bir fonksiyonudur. Moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamış olmasına rağmen, oksidatif strese yol açan ROT'nin sitokin üretiminde önemli rol oynadığı bildirilmekte ve NF- κ B ve aktivatör protein-1 gibi önemli redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek IL-6, IL-8 ve TNF- α genlerinin ekspresyonunun koordinasyonuna yol açtıkları ileri sürülmektedir (Conner ve Grisham, 1996, Elmarakby ve Sullivan, 2012). Oksidatif ajanların fagositik hücreleri uyararak çok miktarda sitokin ve kemokinlerin salınmasına yol açtıkları, ekstrasellüler matriks ve hücre membranlarına doğrudan hasar vererek doku harabiyetine yol açtıkları bildirilirken, lizozomal membranları da bozarak nükleik asitlerin parçalanmasına neden oldukları belirtilmektedir (Zhao ve ark 2007). Oksidatif stresdeki artışlar, enflamatuar sitokinlerin üretimini artırabilmekte ve benzer şekilde, enflamatuar sitokinlerdeki bir artış da serbest radikallerin üretimini uyarabilmektedir (Elmarakby ve Sullivan, 2012).

Hücre membranında bulunan lipitlerin oksidatif bozulması uzun süredir bilinmekle birlikte, oksidatif stresin yol açtığı lipit peroksidasyonundaki kimyasal süreçlerin patoloji ve toksikolojideki önemine yönelik ilgi hala gündemdeki yerini korumaktadır. Vücutta oksidatif stresin arttığı durumlarda plazmada yükselen ilk lipit peroksidasyon biyobelirteçlerinden ve hücrelerde çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biri, lipit peroksidat yıkımının önemli bir metaboliti olan, MDA'dir (Eryavuz ve ark., 2015). Bu nedenle, vücutta serbest radikallerdeki bir artış, MDA'nın aşırı üretimine neden olmakta ve oksidatif stres durumun bir belirteci olarak kullanılmaktadır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar; şişek koyunların kanında, kuzularda önemli olmak ($P < 0.05$) üzere diğer hayvanlardakine göre MDA düzeylerinin yüksek olduğunu ortaya koymuştur (Tablo 1). Bu bulgu, şişek

koyunlarda, oksidatif stresin önemli bir hücrel kaynağı olan ROT üretiminin arttığını göstermektedir. Canlıların temel fizyolojik özelliklerinden biri olan üreme özelliği, koyunların çoğalması ve neslinin devamlılığı için de gerekmektedir (Valasi ve ark., 2012, Takcı, 2019). Koyunlar mevsime bağlı poliöstrik özellik gösteren hayvanlardır (Akçapınar, 1994). Çalışmada şişek koyunlarda gözlenen MDA düzeyindeki artış, bu yaş grubu hayvanlarda cinsel olgunluk döneminden (puberta) kaynaklanmış olabilir (Pérez-Navero ve ark., 2009, Thompson ve ark., 2019). Nitekim, ülkemizde koyunlara koç katımının 20 aylık yaştan sonra başladığı bildirilmektedir (Akçapınar, 1994, Sezenler ve Özder, 2007). Bu çalışmada elde edilen bulgu; hormonal değişiklikler, somatik büyümenin hızlanması ve hücrel metabolizmada bir artış gözlenen insanlarda olduğu (Pérez-Navero ve ark., 2009) gibi koyunlarda da lipit peroksidasyon seviyelerinin cinsel olgunluk döneminde (puberta) değişebileceğini düşündürmektedir. Nitekim, atlarda yapılan bir çalışmada da benzer bulgular bulunmuştur (Smarrsh ve Williams, 2016).

GSH, tüm memeli dokularında oksidatif strese karşı antioksidan savunmada yer alan önemli bir molekül olması nedeniyle, birçok stres formundan hücrelerin korunması için kritik bir savunma sistemini sağlamaktadır (Shelly ve Lu, 2013). Yaşlanmaya bağlı olarak, GSH seviyeleri bir takım dokularda düşmekte, böylece hücreleri strese yenik düşme riskine sokmaktadır (Maher, 2005). Bağışıklık sisteminin, lenfoid hücrelerin hassas bir şekilde dengelenmiş GSH seviyesine sahip olması durumunda en iyi sonucu verdiği ve hücre içi GSH seviyesindeki orta dereceli değişikliklerin bile lenfosit fonksiyonları üzerinde önemli etkileri bulunduğu bildirilmektedir (Dröge, ve Breitkreutz, 2000). Dokularda GSH tükenmesinin, oksidatif stresin artmasına ve sonuçta oksidatif stres aracılı proenflamatuar sitokinlerin kanda yükselmesine sebep olduğu bildirilmektedir (Shelly ve Lu, 2013). Nitekim, Pena ve ark. (1999), kan ve dokularda GSH düzeyini artıran ilaçlar kullanıldığında, proenflamatuar sitokin üretiminin engellenebileceğini göstermişler ve bu bulgunun, çoklu sitokin aracılı hastalık süreçleri için önemli terapötik etkilerinin olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Benzer şekilde, in vitro, endotoksinlere aralıklı olarak maruz kalan alveolar epitel hücrelerine bir GSH öncüsü olan N-asetil-l-sistein (NAC) uygulandığında, TNF- α salgılanmasının azaldığı ve GSH düzeyinin arttığı gözlenmiştir (John ve Haddad, 2011).

Çalışmada, proenflamatuar sitokinlerin üretiminde etkisi olduğu bildirilen (Pena ve ark., 1999, John ve Haddad, 2011) kan GSH düzeyleri bakımından, bu çalışmada incelenen yaşlardaki koyunlar arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlemlendi. Bu bulgu, koyunların yaşamlarının ilk 3 yılına kadar GSH sentez ve düzenlenmesinde bir değişikliğin olmadığına işaret etmektedir. Bununla birlikte, daha ileri yaşlardaki koyunlarda GSH sentezindeki değişimlerin tespit

edilmesi gerekmektedir. Ruminant hayvanlarda GSH sentezinin yaşa bağlı olarak nasıl bir değişim gösterdiğinin belirlenmesi, bu hayvanlarda yaşa bağlı verim ve sağlığı etkileyen kronik hastalıkların patogenezinde oynadığı rolün daha iyi anlaşılmasına ve bu sayede söz konusu hastalıkların tedavi yöntemlerinde iyileşmeye katkı sağlayabilir. Nitekim, insanlarda GSH sentezinde meydana gelen düzensizliklerin; yaşlanma, diyabet, pulmoner ve hepatik fibroz, alkolik ve kolestatik karaciğer hasarları gibi birçok patolojik durumun patogenezinde katkıda bulunduğu dair kanıtların olduğu bildirilmektedir (Shelly ve Lu, 2013). Ruminant hayvanlarda yaşa bağlı GSH değişimlerine yönelik henüz çalışmalar çok yetersiz olmakla birlikte, farklı yaşlarda ve yaş ilerlemiş ruminant hayvanlarda yapılacak yeni çalışmalarla GSH sentezindeki düzensizlikler ve şayet varsa bu düzensizlikten sorumlu moleküler mekanizmaların ortaya çıkarılması, bu hayvanlarda görülen hastalıklara yeni terapötik yaklaşımlar sağlayabilir.

Enfeksiyon veya enflamasyona karşı doğal bağışıklık sisteminin yanıtını değerlendirmek için kan sitokin seviyeleri kullanılabilir (Burton ve ark., 2009). Çok düşük düzeylerde hücrelerin ve dokuların işlevini düzenleyebilen bir grup çözünebilir protein olan sitokinler arasında, bu çalışmada incelenen IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın plazma düzeyleri bakımından sadece şişek koyunlarda IL-6 düzeylerinde önemli bir azalmanın olduğu diğerlerinde ise anlamlı bir değişikliğin olmadığı tespit edildi. Bağışıklık sisteminin sinyal molekülleri olan sitokinlerin, konakçı bağışıklık mekanizmalarında yer alan çeşitli hücrelerin yanıtlarını uyarabilme veya baskılayabilmelerinden dolayı, çalışmada elde edilen bu bulguların, koyunların uygun bağışıklık sistemi aktivitesi için yaşa bağlı değişimlerini göstermesi bakımından önemli olduğu söylenebilir.

Aktive edilmiş monositler tarafından salgılanan bir proenflamatuar sitokin olan IL-1 β , ateş üreterek ve lökositlerin enfeksiyon bölgelerine akmasını teşvik ederek patojenlere karşı savunma tepkisine katkıda bulunur. Çalışmada, farklı yaşlardaki koyunların kan IL-1 β düzeylerinde anlamlı bir farklılığın olmaması, bu çalışmadaki 4-6 aylık kuzuların da erişkin koyunların sitokin üretim düzeylerine sahip olduklarını göstermektedir. Fernández ve ark. (2016), koyunlarda IL-1 β 'nin enflamatuar hastalıkların erken tespiti ve seyri ile patolojik sürecin şiddetinin değerlendirilmesi için bir araç olarak kullanılabilirliğini ileri sürmüşlerdir. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında sağlıklı koyunlarda yaşamın ilk üç yılında kan IL-1 β düzeylerinde önemli bir değişimin olmadığı söylenebilir.

Endotelial hücrelerin geçirgenliği ile anormal anjiyogenezi artırarak ve prostasiklin sentezini inhibe ederek vasküler fizyolojiyi derinden değiştirebilen (Lockwood ve ark., 2008) IL-6, insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak kanda düzeyi yükselmektedir (Maggio ve ark., 2006, Huang ve ark., 2011). Genç koyunlarda; yaşamlarının ilk yazının uzun günlerini ve

ardından sonbaharın kısa günlerini deneyimledikten sonra, steroid hormonların negatif geri bildirimdeki (feed back) azalmalara karşı nöroendokrin duyarlılıklarının ve yumurtalık döngülerini başlatmak için yüksek frekanslı GnRH salınımlarının başlaması gerekmektedir (Neito ve ark., 2013, Foster ve Hileman, 2015.). Geniş anlamda bakıldığında, yetişkinliğe geçişi zamanlayan iç ve dış sinyaller nöroendokrin cevabı oluşturmakta ve bu cevap esnasında gelişen metabolitler de yeterli büyümenin gerçekleştiğine işaret etmektedir (Antunović ve ark., 2011, Takcı, 2019, Thompson ve ark., 2019). Bu çalışmada, şişek koyunlarda insanlarda yaşlanmaya bağlı olarak kan düzeyinde artışlar olduğu bildirilen (Yalçın ve ark., 2011, Huang ve ark., 2011) IL-6'daki azalma da koyunlardaki bu işaretlerden biri olabilir. Bu görüşü desteklemek için koyunlarda daha fazla çalışmaya gereksinim vardır. IL-6'nın, polimorf nükleer lokositlerin kemik iliğinden geçiş süresini kısalttığı ve dolaşıma salınımlarını hızlandırdığı bildirimi (Suwa ve ark., 2000) dikkate alındığında, bu çalışmadaki genç (şişek) koyunların dolaşımında IL-6 seviyesindeki azalmanın, dolaşımdaki polimorf nükleer lökosit sayısına da etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir.

Bağışıklık sistemindeki sitokinlerin rolü, diğer bağışıklık sistemi hücrelerini olayın içine katarak ve aktive ederek konakçı yanıtını yükseltmektedir. Proenflamatuar sitokinlerden TNF- α , esas olarak makrofajlarda ve monositlerde üretilen ve sistemik enflamasyonda rol oynayan bir pleiotropik sitokindir (Dhama ve ark., 2008). TNF- α , kademeli bir şekilde sitokin süreçlerini başlatarak ve vasküler geçirgenliği artırarak lokal bir enflamatuar yanıtı neden olmakta, böylece makrofaj ve nötrofillerin bir enfeksiyon bölgesine toplanmasını sağlamaktadır (Pamir ve ark., 2009). Enflamatuar yanıtın önemli bir düzenleyicisi olması nedeniyle, TNF- α sitokinlerinin aşırı üretimi, bir dizi otoimmün bozukluğun yanı sıra enflamatuar koşulların gelişimi ile de ilişkilendirilmekte ve bu nedenle birçok enflamatuar bozukluğun tedavisinde TNF- α blokerleri terapötik amaçla kullanılmaktadır (Dhama ve ark., 2008). Bu çalışmada incelenen yaşlardaki koyunlarda kan TNF- α düzeyleri bakımından farklılığın olmaması, koyunlarda yaşamın ilk 3 yılına kadar TNF- α 'nın aşırı üretiminin olmadığına işaret etmektedir. Koyunlarda proenflamatuar sitokinlerinin kan düzeylerine yaşın etkisi ile ilgili herhangi bir referans alınacak çalışma bulunamaması nedeniyle, bu çalışmada elde edilen değerler ilk verileri oluşturmaktadır. Bu bulgular, ruminant hayvanlarda yaşa bağlı kan sitokin düzeyindeki değişimlere yönelik çalışmalara katkı sağlaması yanında, hayvanların çeşitli hastalıklarının kontrol edilmesinde sitokin uygulamalarının potansiyeline yönelik gerçekleştirilecek yeni çalışmalara da veri sağlayabilir.

Ruminant hayvanlarda tiroid hormonlarının bağışıklık sistemi de dahil hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde önemli rolleri bulunması nedeniyle

(Huszenicza ve ark., 2002), tiroid hormonların plazma düzeylerindeki değişimler, bağışıklık sistemler üzerinde etkiler içerebilmektedir (Marchiori ve ark., 2015, Kandır ve Keskin, 2016). Nitekim, Tayde ve ark. (2017), hipotiroidili hastalarda TNF- α , IL-6 ve C-reaktif protein (CRP) seviyelerinin yükseldiğini gözlemlemişlerdir. Levotiroksin ile tedavi edilen hipotiroidizimli hastalarda, kontrollere kıyasla plazma proenflamatuar sitokinlerden IL-1, IL-6 ve TNF- α , düzeylerinin anlamlı olarak daha düşük olduğu ve antienflamatuar sitokin olan IL-10 düzeylerinde ise anlamlı bir artış olduğunun gözlemlendiği bildirilmektedir (Marchiori ve ark., 2015). Bu çalışmada, farklı yaşlardaki koyunlardan alınan kan örneklerinde tiroid hormonları bakımından anlamlı bir farkın oluşmaması, yaşamın ilk 3-4 yılına kadar tiroid hormon sentezi ve salınımında yaşın etkisinin olmadığını ve sitokinlerden IL-6'da görülen değişikliklere katkısının olmadığını göstermektedir. İmmunolojik etkilerin proenflamatuar sitokinlerin seviyesi ölçülerek değerlendirilmesinin mümkün olduğu yönündeki bildirim (Elsabahy ve Wooley, 2013) dikkate alınır, çalışmada farklı yaş koyunlarda elde edilen bu bulguların, yaşamın ilk 3 yılına kadar koyunların immünolojik durumlarının bozulmayacağına ve bağışıklık homeostazının etkilenmeyeceğine işaret etmektedir.

SONUÇ

Farklı yaşlardaki koyunlarda proenflamatuar sitokinlerden IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'nın kan düzeyleri ve bu düzeylere etkisi olabilecek lipid peroksidasyonu ile tiroid hormonlarının incelendiği bu çalışmada elde edilen bulgular; koyunlarda 3 yaşına kadar yaşın bağışıklık homeostazını etkilemediğine ve bağışıklık sisteminin daha fazla aktivasyonuna etkisinin olmayabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, ruminant hayvanlarda yaşın sitokinlerin üretim ve düzenlenmesi üzerindeki etkileri ile bu etkilerin ruminant sağlık ve verime sağladığı katkıları yeni bir alandır. Bu alanda daha ileri yaşlardaki hayvanlarda yapılacak yeni araştırmalar, yaşın ruminant hayvanların bağışıklık sisteminde oynadığı rolünün ve hastalıklara direnç üzerindeki fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabilir. Çalışmada özellikle genç koyunlardan elde edilen bulgular; yaşın belirli dönemlerinde meydana gelen fizyolojik değişimlerin oksidatif stres ve proenflamatuar sitokin düzeylerinde değişikliklere yol açabileceğini göstermektedir. Sitokinler arasında "geriatrik sitokin" olarak ifade edilen ve yaşlanmaya bağlı kanda düzeyi artan IL-6'nın genç (şişek) koyunlarda kan düzeylerinin azalması ve bu koyunlarda lipid peroksidasyon düzeyindeki artış, genç koyunların yetişkinliğe geçişi esnasında kanda meydana gelen değişimlerin izlenmesinde faydalı olabilir.

Proje Destek Bilgileri : Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: 18 Kariyer 280).

Etik Kurul Bilgileri : Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (AKÜHADYEK) – 112-18 referans nolu 49533702/163 sayılı araştırma ile Etik Kurul Onayı alındı.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akçapınar H.** Koyun Yetiştiriciliği. MEDİSAN Yayınevi. 1994.1.Baskı. Ankara.
- Antunović Z., Novoselec J., Sauerwein H., Speranda M., Vegara M., Pavic V.** Blood metabolic profile and some of hormones concentration in ewes during different physiological status. *Bulg. J. Agric. Sci.*, 2011; 17: 687-695.
- Beutler E, Duron O, Kelly BM.** Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 1963; 61: 882-888.
- Burton AB, Wagner B, Erb HN., Ainsworth DM.** Serum interleukin-6 and IL-10 concentrations in normal and septic foals. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009; 132: 122-128.
- Conner E.M., Grisham M.B.** 1996. Inflammation, free radicals, and antioxidants. *Nutrition.*, 12(4):274-277.
- Craig N.M., Smith D.W., Pate J.A., Morrison I.W., Knight P.A.** Local cytokine transcription in naïve and previously infected sheep and lambs following challenge with *Teladorsagia circumcincta*. *BMC Veterinary Research* 2014; 10:87.
- Dhama K., Mahendran M., Chauhan R.S., Tomar S.** Cytokines: their functional roles and prospective applications in veterinary practice: A review. *J. Immunol. Immunopathol.* 2008; 10:79-89.
- Dobson RJ, Waller PJ, Donald AD.** Population dynamics of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep: the effect of host age on the establishment of infective larvae. *Int J Parasitol*, 1990; 20:353-357.
- Draper HH., Hardley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1990; 186: 421-431.
- Dröge W., Breitkreutz R.** Glutathione and immune function. *Proc. Nutr. Soc.*, 2000; 59:595-600.
- Elmarakby A.A., Sullivan J.C.** Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *Cardiovascular Therapeutics*, 2012; 30: 49-59.
- Elsabahy M., Wooley K.L.** Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity, *Chem. Soc. Rev.* 2013; 42: 5552-5576.
- Eryavuz A., Küçükkurt İ., İnce S., Fidan AF., Avcı G., Bülbül T.** Kuzularda Rasyona *Yucca Schidigera* Tozu Katılması ve Günlük Dozunun Rumen Fermentasyonu ile Verime Etkilerinin Araştırılması. *Kocatepe V.J.*, 2015;

- Fernández A., Marteles D., Ruiz de Arcaute M., Lacasta D., Conde T., Loste A.** Relationship between Pro-Inflammatory Cytokines, IL-10 Anti-Inflammatory Cytokine and Serum Proteins in Healthy Lambs and with Diarrhea. *Pakistan Vet.J.*, 2016; 36(1): 63-67.
- Foster D.L., Hileman S.L.** *Puberty in the sheep*. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition), 2015; pp, 1441-1485.
- Fulop T., Larbi A., Dupuis G., Le Page A., Frost E.H., Cohen A.A., Witkowski J.M., Franceschi C.** Immunosenescence and Inflamm-Aging As Two Sides of the Same Coin: Friends or Foes? *Frontiers Immunol.*, 2018; 8:1960.
- Gilgun-Sherki Y., Melamed E., Offen D.** Oxidative stress induced neurodegenerative diseases: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. *Neuropharmacology* 2001; 40: 959–975.
- Huang M.C., Greig N.H., Luo W., Tweedie D., Schwartz J.B., Longo D.L.** Preferential enhancement of older human T cell cytokine generation, chemotaxis, proliferation and survival by lenalidomide. *Clin. Immunol.* 2011; 138 (2):201–211.
- Huszenicza GY., Kulcsar M., Rudas P.** Clinical endocrinology of thyroid gland function in ruminants. *Vet. Med. (Czech)*, . 2002; 47:199–210.
- John J., Haddad A.** Redox microenvironment is essential for MAPK-dependent secretion of pro-inflammatory cytokines: Modulation by glutathione (GSH/GSSG) biosynthesis and equilibrium in the alveolar epithelium, *Cellular Immunology*, 2011; 270: 53-61.
- Kandemir Ç., Adanacıoğlu H., Taşkın T., Koşum N.** Türkiye’de Koyun ve Koyun Eti Fiyatlarının Bölgelere Göre Çok Boyutlu Ölçekleme Analizi ile Karşılaştırılması. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2019; 16(3): 315-327.
- Kandır S., Keskin E.** Serum IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α Levels in Thyroidectomized Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, 2016; 22: 297-300.
- Kumar A.A., Tripathi B.N., Sharma B.** Cytokine Profile in Tissues and Blood of Sheep Experimentally Infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J. Appl. Anim. Res.* 2010; 38: 185-189.
- Lockwood C.J., Yen C.F., Basar M., Kayisli U.A., Martel M.** Buhimschi IPreeclampsia-related inflammatory cytokines regulate interleukin-6 expression in human decidual cells. *Am J Pathol.*, . 2008; 172(6): 1571–1579.
- Maggio M., Guralnik J.M., Longo D.L., Ferrucci L.** Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2006; 61: 575–584.
- Maher P.** The effects of stress and aging on glutathione metabolism. *Ageing Res.Rev.*, 2005; 4: 288-314.
- Marchiori R.C., Pereira L.A., Naujorks A.A., Rovaris D.L., Meinerz D.F., Duarte M.M., Rocha J.B.** Improvement of blood inflammatory marker levels in patients with hypothyroidism under levothyroxine treatment. *BMC Endocr. Disord.*, 2015; 15:32 DOI 10.1186/s12902-015-0032-3.
- Neito C.A.R., Ferguson M.B., Macleay C.A., Briegel J.R., Thompson A.N.** Selection for superior growth advances the onset of puberty and increases reproductive performance in ewe lambs. *Animal*, 2013; 7(6): 990-997.
- Pamir N., McMillen T.S., Kaiyala K.J., Schwartz M.W., LeBoeuf R.C.** Receptors for tumor necrosis factor-alpha play a protective role against obesity and alter adipose tissue macrophage status. *Endocrinology*, 2009; 50: 4124–4134.
- Pawelec G.** Age and immunity: What is “immunosenescence”? *Exp.Geront.*, 2018; 105: 4-9.
- Pena L.R., Hill D.B., McClain C.J.** Treatment with glutathione precursor decreases cytokine activity. *J.Parenter. Enteral.Nutr.*, 1999; 23: 1-6.
- Pérez-Navero J.L., Benitez-Sillero J.D., Gil-Campos M., Guillén-del Castillo M., Tasset I., Túnez I.** Changes in oxidative stress biomarkers induced by puberty. *An. Pediatr (Barc.)*, 2009; 70: 424-428.
- Pollak Y., Yirmiya R.** Cytokine-induced changes in mood and behaviour: implications for “depression due to a general medical condition”, immunotherapy and antidepressive treatment. *Int.J.Neuropsychopharmacol.*, 2002; 5: 389-399.
- Scheerlinck J.P.Y., Yen H.H.** Veterinary applications of cytokines. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005; 108: 17-22.
- Sezenler T., Özder M.** Türkgeldi Koyunlarında Erken Yaşta Kuzulmanın Çeşitli Verim Özelliklerine Etkisi. *Tekirdağ Ziraat Fak.Derg.*, 2007; 4 (1): 91-97.
- Shelly C., Lu M.D.** Glutathione Synthesis. *Biochim Biophys Acta.*, 2013; 1830(5): 3143–3153.
- Smarsh D.N., Williams C.A.** Oxidative Stress and Antioxidant Status in Standardbreds: Effect of Age and Acute Exercise Before and After Training. *J.Equine Vet.Sci.*, 2016; 47: 92-106.
- Stowe R.P., Peek M.K., Cutchin M.P., Goodwin J.S.** Plasma Cytokine Levels in a Population-Based Study: Relation to Age and Ethnicity. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2010; 65A (4): 429-433.
- Suchard M.** Immunosenescence: ageing of the immune system. *S. Afr. Pharm. J.*, 2015; 82: 28-31.
- Suwa T., Hogg J.C., English D., van Eeden S.F.** Interleukin-6 induces demargination of intravascular neutrophils and shortens their transit in marrow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2954–60.
- Şeker İ., Köseman A., Baykalır Y., Şeker P.** Koyun Karkaslarının Kalite Sınıflandırılmasında “EUROP” Sistemi ve Türkiye’deki Uygulamalar. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, 2017; 7(3): 309-320.
- Takcı A.** Modifiye U-synch Protokolü ile Mevsim Dışı Senkronize Edilen Akkaraman Kangal Irkı Prepubertal Kuzu ve Primipar Koyunlara GnRH ve hCG Uygulamalarının Fertilite Üzerine Etkisi. *Turk Vet J.*, . 2019; 1(2) : 60-68.
- Tayde P., Bhagwat N., Sharma P., Sharma B., Dalwadi P., Sonawane A., Subramanyam A., Chadha M., Varthakavi P.** Hypothyroidism and depression: are cytokines the link? *Indian J. Endocrinol. Metab.*, . 2017; 21: 886-892.
- Thompson A., Bairstow C., Ferguson M., Kearney G.,**

Macleay C., Thompson H., Pagagoni B. Growth pattern to the end of the mating period influences the reproductive performance of merino ewe lambs mated at 7 to 8 months of age. *Small Rum.Res.*, 2019; 179:1-6.

Valasi I., Chadio S., Fthenakis GC., Amiridis GS. Management of pre-pubertal small ruminants: Physiological basis and clinical approach. *Anim Reprod Sci* 2012; 130(3-4): 126-134

Westendorp R.G.J. Are we becoming less disposable? *EMBO reports*, 2004; 5 (1): 2-6.

Yalçın A.D, Terzioğlu E., Gorczynski R.M. İmmün Yaşlanma. *Türk Geriatri Derg.*, 2011; 14: 276-280.

Zhao W., Diz D.I., Robbins M.E. Oxidative damage pathways in relation to normal tissue injury. *The British Journal of Radiology* 2007; 80(1) : 23-31.

The Effect of Intrauterine Thyme Essential Oil and Dimethyl Sulfoxide Infusion on Clinical Recovery and Serum Haptoglobin, Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Levels in Cows with Clinical Endometritis

Semra KAYA¹, Cihan KAÇAR¹, Oğuz MERHAN², Murat Can DEMİR^{1*}, Umut Çağın ARI³, Abuzer Kafar ZONTURLU⁴

¹Kafkas University, Veterinary Faculty, Obstetrics and Gynecology Department, 36100, Kars, Turkey

²Kafkas University, Veterinary Faculty, Department of Biochemistry, 36100, Kars, Turkey

³Kafkas University, Veterinary Faculty, Department of Reproduction and Artificial Insemination, 36100, Kars, Turkey

⁴Harran University, Veterinary Faculty, Obstetrics and Gynecology Department, 63200, Şanlıurfa, Turkey

ABSTRACT

This study, it was aimed to determine the effect of the intrauterine infusion of thyme essential oil and dimethyl sulphoxide (DMSO) on serum haptoglobin (Hp), tumor necrosis factor (TNF) and nitric oxide (NO) levels and on healing in cows with clinical endometritis. In the study, 90 cows with clinical endometritis were randomly assigned to three groups. Cows in the first group (GI, n=30) were treated with an intrauterine infusion of the 120 mL mixture prepared from 20 mL thyme essential oil, 12 mL of DMSO and 88 mL of distilled water. In the second group of cows (GII; n = 30), 20 mL of thyme essential oil was added into 100 mL of distilled water and given intrauterine. The cows in the last group (GIII; n=30) were given intrauterine after mixing 12 mL of DMSO with 108 mL of distilled water. Rectal, ultrasonographic and vaginoscopic examination were performed 14 days after the treatment. Blood was collected from all animals immediately before and 14 days after treatment. Hp, TNF and NO levels in blood serums were determined by the ELISA commercial kits method. Hp, TNF and NO levels decreased significantly after treatment in all groups. The clinical recovery rate was found to be at the highest GI (93.3%). It was determined as 73.3% in GII and 56.6% in GIII. As a result, it was determined that DMSO administration intrauterine together with thyme essential oil treatment contributed positively to the clinical improvement of endometritis.

Keywords: DMSO, Endometritis, Hp, Thyme essential oil, TNF

Klinik Endometritisli İneklerde İntrauterin Kekik Esansiyel Yağı ile Birlikte Dimetil Sülfoksit Uygulamasının Klinik İyileşme Üzerine ve Serum Haptoglobin, Tümör Nekrozis Faktör ve Nitrik Oksit Düzeylerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışmada, intrauterin kekik yağı ile dimetil sülfoksit (DMSO) uygulamasının endometritisin klinik iyileşmesi, serum haptoglobin (Hp), tümör nekrozis faktör (TNF) ve nitrik oksit (NO) düzeylerine etkisini belirlemek amaçlandı. Çalışmada klinik endometritisli 90 inek rastgele 3 gruba ayrıldı. Birinci gruptaki ineklere (GI; n=30) kekik esansiyel yağı (20 mL), 12 mL DMSO ve 88 mL distile su karıştırıldı ve karışım (120 mL) intrauterin olarak verildi. İkinci gruptaki ineklere (GII; n=30) 20 mL kekik esansiyel yağı 100 mL distile su içerisine eklendi ve intrauterin olarak verildi. Son gruptaki ineklere ise (GIII; n=30) 12 mL DMSO, 108 mL distile su ile karıştırıldıktan sonra intrauterin olarak verildi. Tedaviden 14 gün sonra rektal, ultrasonografik ve vaginoskobik muayene yapıldı. Tüm hayvanlardan tedaviden hemen önce ve tedaviden 14 gün sonra kan alındı. Kan serumlarında Hp, TNF ve NO düzeyleri ELISA ticari kitleri ile belirlendi. Tüm gruplarda Hp, TNF ve NO düzeylerinin tedavi öncesine göre önemli oranda düştüğü saptandı. Klinik iyileşme oranı en yüksek GI'de (%93,3) tespit edildi. GII'de %73,3, GIII'te ise %56,6 olarak belirlendi. Sonuç olarak, intrauterin kekik esansiyel yağ tedavisi ile DMSO verilmesinin endometritisin klinik iyileşmesi üzerine pozitif yönde katkı sağladığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: DMSO, Endometritis, Hp, Kekik esansiyel yağı, TNF

To cite this article: Kaya S. Kaçar C. Merhan O. Demir M.C. Ari U.Ç. Zonturlu A.K. The Effect of Intrauterine Thyme Essential Oil and Dimethyl Sulfoxide Infusion on Clinical Recovery and Serum Haptoglobin, Tumor Necrosis Factor and Nitric Oxide Levels in Cows with Clinical Endometritis. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):45-50

Submission: 21.07.2020 Accepted: 15.12.2020 Published Online: 09.02.2021

ORCID ID: SK: 0000-0002-7520-6631, CK: 0000-0002-2642-697X, OM: 0000-0002-3399-0667, MCD: 0000-0002-3803-069X, UÇA: 0000-0002-7089-6522, AKZ: 0000-0002-9537-5117

*Corresponding author e-mail: murat.can.demir@hotmail.com

GİRİŞ

Endometritis, üreme performansını düşürmesi nedeniyle ciddi ekonomik kayıp oluşturmaktadır (Tsousis ve ark. 2010, Dubuc ve ark. 2011, Kaçar ve Kaya 2014). Bu nedenle en uygun tedavi yönteminin uygulanması büyük bir öneme sahiptir. Endometritis tedavisinde intrauterin antibiyotik kullanımı oldukça yaygındır. Fakat antibiyotikleri inaktif eden birçok mikroorganizma bulunmaktadır. Ayrıca antibiyotikler kalıntı problemi oluşturabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda alternatif tedavi yöntemlerine yönelim artmıştır (Oral ve ark. 2014). Bu yöntemlerden biri de kekik esansiyel yağının kullanımınıdır. Kekik temel olarak timol ve carvacrol gibi esansiyel yağları içermektedir. Bu içerikler antioksidan etki oluşturmaktadırlar (Yanishlieva ve ark. 2006). Bunların dışında α -Terpinyl acetate, p-Cymene, Linalool, γ -Terpinene, β -Caryophyllene, α -Terpineol ve Geraniol içermektedir. Kekik yağının antibakteriyel ve antifungal özelliklere sahiptir (Çetin ve ark. 2011, Oral ve ark. 2014) ve pek çok mikroorganizmaya (Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pyogenes, Proteus ve Bacillus suşları v.b.) karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Çetin ve ark. 2011). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda intrauterin kekik yağı uygulamasının endometritis tedavisinde oldukça başarılı olduğu ortaya konulmuştur (Oral ve ark. 2014).

Dimetil sülfoksit; Pseudomonas, Klebsiella ve Escherichia coli gibi mikroorganizmalar tarafından üretilen biyofilm tabakasının ortadan kaldırılmasını sağlamaktadır. Ayrıca bazı ilaçların etki gücünü artırma gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir (Murat ve ark. 2005). DMSO gibi kimyasal ajanlar endometriyuma verildiğinde uterustaki yangısal cevabı uyarmaktadır. Böylece dolaylı olarak uterus kontraksiyonlarını artırarak uterusun temizlenmesine katkı sağladığı düşünülmektedir (Liu 2011).

Haptoglobin; pozitif akut faz proteindir ve metritis teşhisinde düzeyi ölçülmektedir (Hirvonen ve ark. 1999, Kaya ve ark. 2016). Serum Hp düzeyindeki artış metritisle ilgili klinik belirtiler başlamadan önce hastalık teşhisinin konulmasına olanak sağlamaktadır (Chan ve ark. 2004, Huzzey ve ark. 2009). Tümör Nekrozis Faktör; akut ve kronik yangısal reaksiyonlarda anahtar rol oynar. Hem kendi salınımını hem de sitokin ve kemokinlerin üretimini uyarır (Chan ve ark. 2004). Uterus enfeksiyonlarında düzeyinin oldukça yükseldiği bildirilmektedir (Kim ve ark. 2005, Fischer ve ark. 2010). Postpartum süreçte uterusun hızlı bir şekilde involü olmasına için uterus içeriğinin hızla boşaltılması gerekmektedir. Nitrik oksit, direkt olarak uterusun düz kaslarına etki eder ve kasların gevşemesine neden olur (Li ve ark. 2010, Xue ve ark. 2015). Endometritiste immün sistem aktive olur (Yaralioglu-Gurgoze ve ark. 2005), primer savunma sistemi tarafından aşırı miktarda NO salınır

(Gilbert 2012, Pande ve ark. 2013) ve serum NO düzeyi yükselir (Xue ve ark. 2015). Endometritis varlığının araştırılması açısından çoğunlukla bu üç parametre kullanılmaktadır (Chan ve ark. 2004, Biswal ve ark. 2014, Xue ve ark. 2015).

Sürü fertilitésinin istenilen düzeyde olması için postpartum 3. haftadan sonra devam eden endometritis olgularının tedavi edilmesi gerektiği bilinmektedir (Erçetin ve Çetin 2020). Sunulan çalışmada intrauterin kekik esansiyel yağı ile birlikte DMSO uygulamasının endometritis tedavisindeki etkinliğinin belirlenmesi ve serum Hp, TNF ve NO düzeyi üzerine olan etkileri araştırmak amaçlandı.

MATERYAL ve METOT

Hayvan Materyali

Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan (KAU-HADYEK/2015-114) alınan izin sonrasında gerçekleştirilmiştir. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Araştırma ve Uygulama Çiftliği'nde bulunan en az bir defa doğum yapmış 90 klinik endometritisli inekte yapıldı. Hayvanlar çiftlik şartlarında rutin olarak hazırlanan karma rasyon verilerek beslendi. Suyun ad libitum olarak alınması sağlandı.

Çalışma Yöntemi

Postpartum muayeneler doğumu takip eden 30-35. günler arasında yapıldı. Vulva ve perineal bölgede bulaşmış akıntı varlığı kontrol edildi. Vaginoskobik muayene ile vagina duvarında veya serviks uteriden gelen akıntının varlığı Williams ve ark. (2005) tarafından bildirilen akıntı skoruna göre değerlendirilerek endometritisler derecelendirildi. Klinik endometritisli olduğu belirlenen inekler rastgele 3 gruba ayrıldı. Tüm ineklerden (vena cocygea) tedaviden hemen önce ve tedaviden 14 gün sonra jelli vakumlu serum tüplerine (8,5 mL) kan alındı.

Grupların Belirlenmesi

Grup I (GI):

Birinci gruba alınan ineklere (GI; n=30) kekik esansiyel yağı içeren hazır müstahzar (20 mL, Mindivan, Türkiye) ve 12 mL DMSO (Emplura®, Merck, USA) enjektöre çekildikten sonra toplam doz 120 mL'ye tamamlanacak şekilde distile su (88 mL) ile karıştırıldı. Hazırlanan karışım intrauterin olarak verildi.

Grup II (GII):

İkinci gruptaki ineklere (GII; n=30) ise ilk gruptan farklı olarak DMSO verilmedi. Kekik esansiyel yağı içeren hazır müstahzardan 20 mL alındı ve üzerine 100 mL distile su eklendi. Hazırlanan 120 mL'lik karışım intrauterin olarak verildi.

Grup III (GIII):

Son gruptaki ineklere ise (Grup III; n=30) 12 mL DMSO, 108 mL distile su ile karıştırıldıktan sonra intrauterin olarak verildi.

Tedavisi yapılan inekler 14 gün sonra tekrar vaginoskobik, rektal, ultrasonografik muayeneler uygulandı ve iyileşme olup olmadığı belirlenerek sonuçlar kaydedildi.

Kan Serumlarının Eldesi

Tüm hayvanlardan intrauterin tedaviden hemen önce ve tedaviyi takip eden 14. günde kan alındı. Alınan kanlar 3000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve ölçümler yapıncaya kadar -20°C 'de depolandı. Alınan serumlarda TNF, Hp ve NO düzeyleri ELISA ticari kitleri kullanılarak belirlendi.

İstatistiksel Analiz

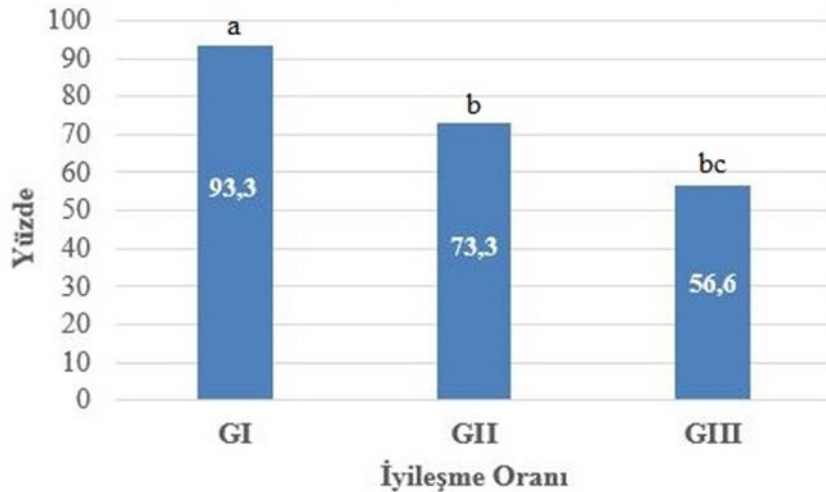
İstatistiksel analizler SPSS® (SPSS 18, IL, USA) programında yapıldı. Gruplar arasında iyileşme oranları ki-kare yöntemiyle karşılaştırıldı. Her bir grubun tedavi öncesi ve tedavi sonrası normallik sınamaları Shapiro-Wilk test ile belirlendi. Grup içinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası TNF, Hp ve NO düzeylerinin karşılaştırılması normal dağılım gösterenlerde Paired T testi ile yapılırken, normal dağılım göstermeyen değerlerde ise Wilcoxin testi uygulandı. Gruplar arasındaki TNF, Hp ve NO düzeyindeki farklılıklar ANOVA-Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı. Sonuçlar ortalama \pm standart hata ($X\pm SE$) olarak verildi. Elde edilen sonuçlarda $P<0,05$ ifadesi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Vajinal akıntı skoruna göre hayvanlar hafif (E1), orta (E2), şiddetli (E3) endometritisi olarak sınıflandırıldığında, Grup I' de 14 hayvanda E1, 11

hayvanda E2 ve 5 hayvanda E3 belirlenirken, Grup II'de 10 inekte E1, 16 inekte E2 ve 4 inekte E3 olduğu belirlendi. Son grupta ise 15 inekte E1, 11 inekte E2 ve 4 inekte E3 olduğu saptandı. Tedavileri takip eden 14. günde Grup I'de klinik iyileşme oranı %93,3 olarak tespit edilirken, Grup II'de bu oran %73,3 olarak tespit edildi. Grup III'te ise klinik iyileşme oranı %56,6 olarak belirlendi. Grup I ile Grup II'de iyileşme oranları bakımından fark istatistiksel olarak önemli ($P=0,038$) bulundu. Grup I ile Grup III arasındaki fark benzer şekilde istatistiksel olarak önemli ($P=0,001$) belirlenirken, Grup II ile Grup III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsız ($P=0,176$) bulundu (Şekil 1).

Gruplardaki serum TNF, Hp ve NO düzeyleri Tablo 1'de sunulmuştur. Serum TNF düzeyinin tedavi öncesi GI ve GII grubunda benzer olduğu belirlendi ($P>0,05$). TNF düzeyinin tedavi öncesi ve tedavi sonrası en düşük GIII'te olduğu belirlendi ($P=0,001$). Tedaviyi takiben yapılan ölçümlerde TNF düzeyinin GI ve GII'de benzer olduğu saptandı ($P>0,05$). GI ve GII'de tedavi öncesi ve tedavi sonrası Hp ve NO düzeyleri bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark belirlenmedi. Fakat GI ve GII'de Hp düzeyinin hem tedavi öncesi hem de tedavi sonrası GIII'ten önemli oranda yüksek olduğu belirlendi ($P=0,001$). Tedavi öncesi NO düzeyinin GIII'te diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli oranda düşük olduğu tespit edilirken ($P=0,001$), tedavi sonrası serum NO düzeylerinin tüm gruplarda benzer olduğu saptandı. Tüm gruplarda tedavi sonrası serum TNF, Hp ve NO düzeyinin, tedavi öncesi değerlere göre önemli oranda azaldığı saptandı (Tablo 2). Bu değerlerdeki azalmaların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi.



Şekil 1: Gruplarda iyileşme oranları

Figure 1: Recovery rates in groups

^{a,b}: Farklı harfler gruplar arası ki-kare testine göre istatistiksel farklılıkları göstermektedir. GI ile GII ($P=0,038$) ve GI ile GIII ($P=0,001$) arasında istatistiksel farkın anlamlı olduğu belirlendi. GII ile GIII arasında iyileşme oranı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0,05$). GI: Kekik esansiyel yağı+dimetil sülfoksit+distile su, GII: Kekik esansiyel yağı+distile su, GIII: Dimetil sülfoksit+distile su.

Tablo 1. Gruplarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası ortalama serum TNF, Hp ve NO düzeyleri
Table 1. Average serum TNF, Hp and NO levels in groups before and after treatment

Gruplar	Tedavi Öncesi			Tedavi Sonrası		
	TNF (pg/mL)	Hp (g/L)	NO (µmol/L)	TNF (pg/mL)	Hp (g/L)	NO (µmol/L)
GI	394,8±14,9 ^a	0,14±0,01 ^x	9,1±0,5 ^e	290,3±6,0 ^c	0,06±0,01 ^q	4,01±0,2 ^f
GII	394,4±14,8 ^a	0,16±0,01 ^x	8,9±0,4 ^e	296,9±6,7 ^c	0,06±0,01 ^q	4,3±0,2 ^f
GIII	299,3±12,2 ^b	0,10±0,01 ^y	5,4±0,4 ^g	234,2±10,3 ^d	0,04±0,01 ^z	3,9±0,2 ^f
P değeri	a:b: P=0,001	x:y: P=0,001	e:g: P=0,001	c:d: P=0,001	q:z: P=0,001	P>0,05

Değerler ortalama±standart hata (X±SE) olarak verilmiştir. Aynı sütunda farklı harflere sahip değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05). Hp: Haptoglobin, NO: Nitrik Oksit, TNF: Tümör nekrozis faktör. GI: Kekik esansiyel yağ+dimetil sülfoksit+distile su, GII: Kekik esansiyel yağ+distile su, GIII: Dimetil sülfoksit+distile su.

Tablo 2. Tedavi öncesi ve tedavi sonrası serum TNF, Hp ve NO düzeylerinin karşılaştırılması
Table 2. Comparison of serum TNF, Hp and NO levels before and after treatment

Gruplar	Tedavi Öncesi-Sonrası Karşılaştırma	Önem
GI	TÖ-TNF/TS-TNF	0,001
	TÖ-Hp/TS-Hp	0,001
	TÖ-NO/TS-NO	0,001
GII	TÖ-TNF/TS-TNF	0,001
	TÖ-Hp/TS-Hp	0,001
	TÖ-NO/TS-NO	0,001
GIII	TÖ-TNF/TSTNF	0,001
	TÖ-Hp/TS-Hp	0,001
	TÖ-NO/TS-NO	0,002

P<0,05 önemlidir. TÖ-TNF: Tedavi öncesi tümör nekrozis faktör; TÖ-Hp: Tedavi öncesi haptoglobin; TÖ-NO: Tedavi öncesi nitrik oksit, TS-TNF: Tedavi sonrası tümör nekrozis faktör; TS-Hp: Tedavi sonrası haptoglobin, TS-NO: Tedavi sonrası nitrik oksit

TARTIŞMA

Organik üretim yapan süt işletmelerinde özellikle antimikrobiyal ilaçların kullanılması istenilmediği için alternatif tedavi yöntemlerine yönelim artmıştır (Pinedo ve ark. 2015). Bu yüzden ilgili işletmelerde ucuz ve kalıntı problemi oluşturmayan yöntemler tercih edilmektedir (Oral ve ark. 2014). Uterus enfeksiyonlarının tedavisinde intrauterin kekik uygulaması ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (Pinedo ve ark. 2015, Lehimcioğlu ve ark. 2019). Kekik yağı içerisinde temel olarak bulunan carvacrol'ü içeren ticari preparat olan UterFlush®'in toksik puerperal metritisli ineklerde iyileşme oranını diğer alternatif tedavi yöntemlerine göre daha fazla artırdığı ve bu hayvanlarda üreme performanslarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir (Pinedo ve ark. 2015). Repeat Breeder'lı ineklerde tohumlama sonrası intrauterin carvacrol infüzyonunun gebelik oranlarını

bir miktar artırdığı tespit edilmiştir (Lehimcioğlu ve ark. 2019). Oral ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada endometritisli ineklere kekik esansiyel yağı intrauterin verilmiş ve tedavi sonrası ilk östrüste tohumlanmışlardır. Gebelik oranının oldukça yüksek olduğu (%94,4) belirlenmiştir. Sunulan çalışmada bu çalışmayla uyumlu şekilde hayvanlarda iyileşme oranının (%73,3) yüksek olduğu belirlenmiştir. Carvacrol'ün özellikle antibiyotiğe dirençli bakterileri inhibe etmesi ve uterus üzerine yan etkisinin olmaması gibi yararlı etkileri ve fertilitiyi artırması gibi pek çok avantaja sahip olduğu bilgilerini doğrulamaktadır (Lehimcioğlu ve ark. 2019). Dirençli uterus enfeksiyonlarında antibiyotiklerin uterusun derin katmanlarına ulaşabilmesi amacıyla taşıyıcı madde olarak DMSO kullanımının yararlı olabileceği bildirilmektedir (Küplülü ve ark. 2011). Kısırlıklarda DMSO'nun %10-30 oranında intrauterin uygulamasının endometriyumunun histolojik yapısı

SONUÇ

üzerine zararlı etkisinin olmadığı açıklanmıştır (Ley ve ark. 1989). Kısıraklarda DMSO (%30) kullanımının E. coli, K. pneumoniae ve P. aeruginosa'nın neden olduğu endometritislerin tedavisinde (biyofilm oluşumunu ve biyofilm içindeki bakterilerin canlılığını azaltması ile) umut vaat ettiği bildirilmektedir (Loncar ve ark. 2017). Ayrıca intrauterin DMSO uygulamasının bakteriyel infiltrasyonu azaltmasının yanı sıra periglândüler fibrozisi de azalttığı saptanmıştır (Ley ve ark. 1989). Kısıraklarda endometritisin tedavisinde DMSO'nun kullanımıyla ilgili pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen ineklerde bu amaçla DMSO kullanımı hakkında az sayıda araştırmaya rastlanmaktadır (Frazer ve ark. 1987, Ley ve ark. 1989, Loncar ve ark. 2017). Repeat breeder ineklerde yapılan bir çalışmada DMSO'nun biyofilm tabakasını %60'dan %35'e düşürdüğü tespit edilmiştir. DMSO'nun hem biyofilm tabakasını azalttığı hem de bakteriyel lipopolisakaritlerin temizlenmesini sağladığı ortaya konulmuştur. Bu azalmanın DMSO'nun mukolitik özelliğinden kaynaklandığı açıklanmıştır (Ahmadi ve ark. 2017). Ayrıca kronik endometritislerde DMSO kullanımının kan dolaşımını artırarak ve dokulardaki anti-iskemik ve hipoksik koruyucu mekanizmalara etki ederek katkı sunduğu düşünülmektedir (Ley ve ark. 1989). Özellikle intrauterin antibiyotik uygulamalarından önce DMSO lavajının antibiyotik etkinliğini artırdığı bildirilmektedir (Ahmadi ve ark. 2017). Erçetin ve Çetin (2020) tarafından yapılan çalışmada postpartum dönemde DMSO'nun uterus içine uygulanmasının sayısal olarak gebelik oranlarını artırdığı belirlenmiştir. Fakat aynı çalışmada DMSO ile birlikte antibiyotiğin (oksitetrasiklin) intrauterin kullanımının fertilitite parametrelerini artırmadığı ve gebelik oranında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Gebelik oranındaki azalmanın endometritis tanısı konulmadan doğrudan postpartum dönemde kullanılan antibiyotiğin uterusu iritasyona neden olarak kimyasal endometritis oluşturmasından kaynaklandığı bildirilmektedir. Sunulan çalışmada ise iyileşme oranının en fazla Gİ'de olduğu belirlendi. Böylece DMSO'nun kekik yağının etkinliğini artırdığı görüldü.

Uterus enfeksiyonlarında serum Hp düzeyinin sağlıklı hayvanlardan daha yüksek olduğu (Chan ve ark. 2004) ve endometritis tedavisinin etkinliğinin takibinde kullanılan akut faz proteini olduğu bilinmektedir (Biswal ve ark. 2014). Benzer şekilde endometritisli hayvanlarda serum TNF (Kim ve ark. 2005, Fischer ve ark. 2010) ve NO düzeyinin sağlıklı olanlardan daha yüksek olduğu bilinmektedir (Kaya ve ark. 2017). Sunulan çalışmada bu çalışmalarla benzer şekilde tedavi öncesi serum Hp, TNF ve NO düzeylerinin tedaviyi takiben önemli oranda düştüğü saptandı. Bu düşüşün iyileşmelere bağlı olarak şekillendiği söylenebilir.

Sonuç olarak, intrauterin kekik esansiyel yağı ve DMSO infüzyonlarının endometritisin klinik iyileşmesi üzerine pozitif yönde katkı sağladığı belirlenmiştir. DMSO'nun serum Hp, TNF ve NO düzeyi üzerine yalnızca kekik kullanılan gruba göre önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirlenmiştir. Kekik esansiyel yağı ile birlikte DMSO'nun intrauterin uygulaması sonrası klinik iyileşme oranının daha yüksek olduğu saptandı. Özellikle organik yetiştiricilik yapılan işletmelerde antibiyotiklerin kalıntı problemlerinden kurtulmak adına endometritis tedavisinde kekik esansiyel yağı ile DMSO kombinasyonu kullanılabilir.

Proje Destek Bilgileri: Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Bilimsel Araştırmaları Projeleri Koordinatörlüğü tarafından **2016-TS-47** kodu desteklenmiştir.

Sunum Bilgileri: Bu çalışma Proceedings of the 22nd Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) (27-29 September 2018) ve I. Uluslararası Sürü Sağlığı ve Yönetimi Kongresi'nde Özet bildiri olarak sunulmuştur.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma Kafkas Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (**KAU-HADYEK/2015-114**) izin alındıktan sonra gerçekleştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahmadi MR, Derakhshandeh A, Shirian S, Daneshbod Y, Ansari-Lari M, Nazifi S. Detection of bacterial biofilm in uterine of repeat breeder dairy cows. Asian Pac. J. Reprod. 2017; 6(3): 136-139.
- Biswal SS, Das S, Balasubramanian S, Mohanty DN, Sethy K, Dasgupta M. Serum amyloid A and haptoglobin levels in crossbred cows with endometritis following different therapy. Vet. World. 2014; 7(12): 1066-1070.
- Çetin B, Çakmakçı S, Çakmakçı R. The investigation of antimicrobial activity of thyme and oregano essential oils. Turkish J. Agric. For. 2011; 35(2): 145-154.
- Chan JPW, Chu CC, Fung HP, Chuang S Te, Lin YC, Chu RM, Lee SL. Serum haptoglobin concentration in cattle. J. Vet. Med. Sci. 2004; 66(1): 43-46.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Randomized clinical trial of antibiotic and prostaglandin treatments for uterine health and reproductive performance in dairy cows. J. Dairy Sci. 2011; 94(3): 1325-1338.
- Erçetin E, Çetin Y. Effect of postpartum routine intrauterine treatment on fertility in dairy cows. Van Vet. J. 2020; (2): 60-66.

- Fischer C, Drillich M, Oda S, Heuwieser W, Einspanier R, Gabler C.** Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reprod. Fertil. Dev.* 2010; 22(5): 818–829.
- Frazer GS, Rosol TJ, Threlfall WR.** Effect of serial intrauterine dimethyl sulfoxide infusions on the incidence of periglandular fibrosis in category II horse endometria. *Theriogenology.* 1988; 29(5): 1091-1098.
- Gilbert RO.** The effects of endometritis on the establishment of pregnancy in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 2012; 24(1): 252–257.
- Hirvonen J, Huszenicza G, Kulcsár M, Pyörälä S.** Acute-phase response in dairy cows with acute postpartum metritis. *Theriogenology.* 1999; 51(6): 1071–1083.
- Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, Von Keyserlingk MAG.** Short communication: Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 2009; 92(2): 621–625.
- Kaçar C, Kaya S.** İneklerde uterus enfeksiyonları ve üreme performansı üzerine etkisi. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2014; 20(6): 975–982.
- Kaya S, Merhan O, Kaçar C, Colak A, Bozukluhan K.** Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis. *Vet. World.* 2016; 9(10): 1056–1062.
- Kaya S, Ögün M, Özen H, Kuru M, Sahin L, Kükürt A, Kaçar C.** The impact of endometritis on specific oxidative stress parameters in cows. *J. Hell. Vet. Med. Soc.* 2017; 68(2): 231–236.
- Kim IH, Na KJ, Yang MP.** Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis. *J. Reprod. Dev.* 2005; 51(6): 757–764.
- Küplülü Ş, Vural R, Polat İM.** İneklerde uterus enfeksiyonlarının etiopatogenezi, klinik semptomları ve sağaltım girişimleri. *Türkiye Klinikleri J. Vet. Sci.* 2011; 2(1): 58–65.
- Lehimcioğlu NC, Öztürkler Y, Yıldız S, Arı UÇ.** The Effect of intrauterine infusion of carvacrol after insemination on conception rate in repeat breeder cows subjected to progesteron based estrus synchronization protocol. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2019; 25(5): 633-638.
- Ley WB, Bowen JM, Sponenberg DP, Lessard PN.** Dimethyl sulfoxide intrauterine therapy in the mare: Effects upon endometrial histological features and biopsy classification. *Theriogenology.* 1989; 32(2): 263–276.
- Li DJ, Liu YF, Li YF, Lv Y, Pei XY, Guo DZ.** Significance of nitric oxide concentration in plasma and uterine secretes with puerperal endometritis in dairy cows. *Vet. Res. Commun.* 2010; 34(4): 315–321.
- Liu IKM.** The diagnosis, causes and treatment of persistent endometritis in the mare. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2011; 35(2): 256-261.
- Loncar KD, Ferris RA, McCue PM, Borlee GI, Hennet ML, Borlee BR.** In vitro biofilm disruption and bacterial killing using nonantibiotic compounds against gram-negative Equine uterine pathogens. *J. Equine Vet. Sci.* 2017; 53: 94-99.
- Murat N, Demir Ö, Can E, Gidener S, Esen A.** Optimum concentration of DMSO in human corpus cavernosum studies. *Turk Urol. Derg.* 2005; 31(1): 17-20.
- Oral H, Kuru M, Kulaksız R, Kaya S.** Kronik endometritisli ineklerde intrauterin uygulanan kekik yağının gebe kalma oranı üzerine etkisi. *Lalahan Hayv. Araş. Enst. Derg.* 2014; 54(2): 57–61.
- Pande M, Das GK, Khan FA, Sarkar M, Pathak MC, Prasad JK, Kumar H.** Endometritis impairs luteal development, function, and nitric oxide and ascorbic acid concentrations in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Trop. Anim. Health Prod.* 2013; 45(3): 805–810.
- Pinedo PJ, Velez JS, Bothe H, Merchan D, Piñeiro JM, Risco CA.** Effect of intrauterine infusion of an organic-certified product on uterine health, survival, and fertility of dairy cows with toxic puerperal metritis. *J. Dairy Sci.* 2015; 98(5): 3120–3132.
- Tsousis G, Sharifi AR, Hoedemaker M.** Increased risk of conception failure in German holstein friesian cows with chronic endometritis. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 45(6): 1114–1117.
- Xue S, De-jun L, Guo-feng F, Bei L, Yun-feng L.** Dynamic analysis of nitric oxide and total oxidant capacity in cow uterine secretion with subclinical endometritis. *J. Northeast Agric. Univ.* 2015; 22(1): 35–39.
- Williams EJ, Fischer DP, England GCW, Dobson H, Pfeiffer DU, Sheldon IM.** Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the inflammatory response to endometritis in cattle. *Theriogenology.* 2005; 63:102–117
- Yanishlieva N V., Marinova E, Pokorný J.** Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 2006; 108: 776–793.
- Yaralioglu-Gurgoze S, Cetin H, Cen O, Yilmaz S, Atli MO.** Changes in malondialdehyde concentrations and glutathione peroxidase activity in purebred Arabian mares with endometritis. *Vet. J.* 2005; 170(1): 135–137.

Molecular Characterization of *Trichophyton Verrucosum* Strains Isolated From Cattle by PCR-RFLP

Osman Yaşar TEL¹, Ayfer GÜLLÜ YÜCETEPE^{1*}, Oktay KESKİN¹, Sevil ERDENLİĞ GÜRBİLEK¹

¹ Harran University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology, 63000, Şanlıurfa, Turkey

ABSTRACT

Dermatophytes infect tissues containing keratin in humans and animals, causing dermatophytosis infection. *Trichophyton verrucosum* is the most common agent of bovine dermatophytosis cases. Trichophytosis causes big economic lossess throughout the world and also threatens human health by being a zoonosis. *T. verrucosum* is usually isolated from cattle. Cattle are the natural reservoirs of this agent. The aim of this study is to isolate disease-causing dermatophytes in cattle and to carry out molecular separation of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of the isolated *T. verrucosum* strains by PCR- Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). For this purpose, 90 samples were taken from the cattle with dermatophytosis for cultural examination. As a result of the culture of these samples, 35 (38.8%) *T. verrucosum* were isolated and identified. DNA isolation of these strains was made and amplification of ITS regions was performed. It was only one RFLP profile was found according to the results of RFLP analysis of *T. verrucosum* strains using MvaI and HinfI enzymes. At the end of study, it was founded that the isolated *T. verrucosum* strains showed a single profile by PCR-RFLP analysis and PCR-RFLP was a useful tool for the molecular characterization of the strains. It was also concluded that PCR-RFLPs of strains from different regions or even from different countries might be necessary in order to detect different profiles of the tested samples.

Keywords: Cattle, Dermatophytosis, PCR-RFLP, *Trichophyton verrucosum*.

Sığırlardan İzole Edilen *Trichophyton Verrucosum* Suşlarının PCR –RFLP ile Moleküler Karakterizasyonu

ÖZ

Dermatofitler, insan ve hayvanlarda keratin içeren dokuları infekte ederek dermatofit infeksiyonuna neden olmaktadır. *Trichophyton verrucosum* sığır dermatofitozis olgularının en yaygın etkenidir. Trichophytosis, bütün dünyada hayvancılık sektöründe önemli ekonomik kayıplara neden olması yanında zoonoz olmasıyla da insan sağlığını tehdit etmektedir. Sığırlardan genellikle *T. verrucosum* izole edilmektedir. Sığırlar bu etkenin doğal rezervuarıdır. Bu çalışmanın amacı, sığırlarda hastalığa neden olan dermatofitlerinin izolasyonu ve izole edilen *T. verrucosum* suşlarının Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerinin PCR-RFLP ile moleküler ayrımının yapılmasıdır. Bu amaçla dermatofitozisli sığırlardan 90 adet örnek alınarak kültürleri yapıldı. Bu örneklerin kültürü sonucunda 35 (%38,8) adet *T. verrucosum* izole ve tanımlandı. Bu suşların DNA izolasyonu gerçekleştirilerek ITS bölgelerin amplifikasyonu gerçekleştirildi. *T. verrucosum* suşlarının MvaI ve HinfI enzimleri kullanılarak yapılan Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analizleri sonucunda bir adet RFLP profiline rastlandı. Sonuç olarak, izole edilen *T. verrucosum* suşlarının PCR-RFLP sonucunda tek bir profile sahip olduğu, farklı profil örneklerinin saptanması için farklı bölgelerden hatta farklı ülkelerden suşların PCR-RFLP'lerinin yapılması gerektiği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dermatofitozis, PCR-RFLP, Sığır, *Trichophyton verrucosum*

To cite this article: Tel O.Y., Güllü Yücepe A., Keskin O., Erdenliğ Gürbilek S. Molecular Characterization of *Trichophyton Verrucosum* Strains Isolated From Cattle by PCR-RFLP. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):51-56

Submission: 24.07.2020 Accepted: 01.02.2021 Published Online: 18.02.2021

ORCID ID; OYT: 0000-0001-7848-3899, AGY: 0000-0002-9842-3305, OK: 0000-0002-5977-7872, SEG: 0000-0002-0377-2650

*Corresponding author e-mail: ayfergullu@harran.edu.tr

GİRİŞ

Dermatofitozis pet ve çiftlik hayvanlarında en sık görülen mantar enfeksiyonudur. Günümüzde hayvan ve insanlarda enfeksiyona yol açan dermatofitler; *Microsporum*, *Trichophyton* ve *Epidermophyton* olarak 3 cins içinde sınıflandırılırlar. Evcil hayvanlardan çok farklı türde dermatofitler izole edilmesine rağmen, yalnızca *Microsporum* ve *Trichophyton* cinsine ait birkaç zoofilik tür (*M. canis*, *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes*, *T. equinum*, ve *M. gypseum*) enfeksiyonların çoğundan sorumludur. Sığırlarda hastalık vakalarının çoğundan sorumlu olan en yaygın tür, *Trichophyton verrucosum*'dur. Zoonotik öneme sahip *T. verrucosum* türlerinin alt tiplerini belirlemek, hastalığın tedavisi ile yayılmasını önleme ve kontrol altına almada oldukça yararlıdır (Arda, 1980).

Mantar türlerinin alt tiplerini belirlemek için çeşitli yöntemlerden yararlanılmaktadır. Fakat halen altın standart denilecek bir yöntem belirlenememiştir. Mitokondrial DNA'daki kesim bölgesi polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP), DNA üzerinde ribozomal RNA'nın (rRNA) kodlandığı bölgede (rDNA) bulunan internal transcribed spacer (ITS) bölgelerinin sekanslanması (Jackson ve ark. 1999, Mochizuki ve ark. 1999) ve polymerase chain reaction (PCR) [RAPD (random amplification of polymorphic DNA), AP-PCR (arbitrarily primed) ve PCR fingerprinting], tür ve suşların ayırt edilmesinde önemli yararlar sağlamıştır (Kac 2000, Thomas ve Xu, 2002). PCR-RFLP *T. verrucosum*'un intraspesifik polimorfizminin ortaya çıkarılmasında değerli bir araç olduğu düşünülmektedir (Mirzahoseini ve ark. 2009). Hinfl ve MvaI enzimleriyle ITS I PCR ürünlerini kestikleri çalışmada 2 adet *T. verrucosum* profili elde etmişlerdir. Tip II profilin en yaygın profil olduğunu belirtmişlerdir (Neji ve ark. 2016).

Bu çalışmanın amacı, sığırlarda hastalığa neden olan *T. verrucosum* izolasyonu ve izole edilen *T. verrucosum* suşlarının Internal Transcribed Spacer (ITS) bölgelerinin PCR-RFLP ile moleküler ayrımının yapılmasıdır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Şanlıurfa ilinin farklı ilçe ve merkez ilçelerinden Mikrobiyoloji Anabilim Dalına yapılan başvurular doğrultusunda teşhis amacıyla örnekler toplandı. Örnekler, genellikle aile tipi küçük işletmelerden farklı cinsiyet ve yaşlardaki hayvanlardan alındı (Tablo 1). Bu amaçla klinik olarak dermatofitoz şüpheli hayvanlardan *T. verrucosum* yönünden incelenmek üzere toplam 90 sığır orijinli örnek (deri döküntüleri ve kıl) alındı. Örnek alınmadan önce derideki büyüklüğü, lezyonların yeri, şekli, yayılma durumu gibi önemli noktalara dikkat edilerek, lezyon ve çevresi %70'lik alkol ile iyice silindi ve deri döküntüleri steril bistüri ile alındı, kıllar ise

steril bir pensle çekilerek steril materyal kaplarına alındı ve en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı

Kültür

T. verrucosum üretilmesi amacıyla Sabouraud Glucose Agar (SGA) (Merck, Darmstadt, Germany)'a thiamine (4 mg/ml), inositol (100 mg/ml), cycloheximide (0,5 mg/ml) ve chloramphenicol (0,1 mg/ml) katılarak kullanıldı. Laboratuvara getirilen örneklerden SGA'a ekimler yapıldı. Besiyerleri, 37°C'lik etüvde 3-4 günde bir oluşan üremeler kontrol edilerek dört hafta süreyle inkübasyona bırakıldı. Laktofenol pamuk mavisi boyası kullanılarak kolonilerden bir kısım alınarak lam-lamel arası preparatlar hazırlandı. İnkübasyon sonunda kolonilerin üreme hızları, yüzey renkleri, morfolojileri, tabandaki pigmentleri ve mikroskopik incelemede konidyumların varlığı, hiflerin yapısı göz önüne alınarak *T. verrucosum* yönünde identifikasyonları gerçekleştirildi (Larone, 2002). Ayrıca *Trichophyton* şüpheli kolonilerin *Trichophyton* agara subkültürleri yapılarak makroskopik ve mikroskopik özellikleri incelendi.

Moleküler Metodlar

DNA Ekstraksiyonu

Liu ve ark. (2000)'nın bildirdiği DNA ekstraksiyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde göre steril öze ile az miktarda miselyum 500 µl'lik lizis solüsyonu (400 mM Tris-HCl [pH 8,0], 60 mM EDTA [pH 8,0], 150 mM NaCl, %1 SDS) içeren bir ependorf tüpüne alınarak, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu tüpe 150 µl potasyum asetat solüsyonu eklendikten sonra, tüp hafifçe vortekslelendikten sonra, 14.000 devirde 1 dk. santrifüje edildi. Süpernatant başka bir ependorf tüpüne aktarılarak, tekrar yukarıdaki şartlarda santrifüje edildi. Elde edilen süpernatant nükleaz-ari bir ependorf tüpüne aktarılarak üzerine eşit hacimde izopropil alkol eklendi. Tüp hafifçe ters yüz edilerek karıştırıldı ve 12.000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant pelet kaybedilmeden dikkatli bir şekilde uzaklaştırıldı. Elde edilen DNA peleti, 300 µl %70'lik etanol ile vortekslenip santrifüje edilerek yıkandı. Pelet 10.000 devirde 1 dakika santrifüje edildikten sonra, süpernatant atılarak ve DNA peleti oda sıcaklığında tutularak kurutuldu. DNA peleti 50 µL nükleazsız su içerisinde çözüldü

ITS Bölgesinin PCR İşlemi ile Çoğaltılması

PCR reaksiyon karışımı; 5 µl template DNA, 1,5-3 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTP karışımı, 0,7 µM primerler (ITS1, ITS4), 1/10 reaksiyon buffer, 1,25 U Taq DNA polimeraz ve son hacmi 50 µl olacak şekilde steril distile sudan oluştu. PCR inkübasyon, sıcaklık ve süreleri sırasıyla, 94°C 'de 3 dakikalık ilk denatürasyon, 94°C'de 1 dakikalık denatürasyon, 60°C'de 1 dakika primer bağlanması, 72°C'de 1 dakikalık ekstensiyonu içeren 35 sıklıktan oluştu (Hsiao ve ark. 2005). İzole edilen *T. verrucosum* suşlarının ITS bölgesini çoğaltmak için PCR işleminde

kullanılmak üzere White ve ark. (1990) tarafından oldukça duyarlı ve özgün olduğu bildirilen mantarlara özgü universal primerler kullanıldı.

Forward primer olarak: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')
Reverse primer olarak: ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATGA TATGC-3').

PCR Ürünlerinin Görüntülenmesi ve Pürifikasyonu

Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jel elektroforezi ile ayrımlanarak UV ışığı altında kontrol edildi.

PCR-RFLP

Bu amaçla *Hin*I ve *Mva*I (Thermo Scientific, USA) enzimleriyle PCR ürünleri kesildi. Bütün işlemler üretici firmanın protokolleri doğrultusunda yapıldı. Reaksiyon karışımı

10 ul PCR reaksiyon ürünü (~0.1-0.5 µg of DNA)

17 ul nukleaz içermeyen su

2 ul 10x buffer

2 ul enzim (*Hin*I veya *Mva*I) 'den oluştu.

Bu karışım hafifçe birkaç dakika karıştırıldıktan sonra 37°C'de 1-16 saat inkübasyona bırakıldı.

ITS Bölgesinin Sekanslanması

PCR ürünleri Big Dye Cycle Sequencing kit v 3.1 kullanılarak ABI PRISM 3130XL automated sequencer (Applied Biosystems) ile çift taraflı olarak sekanslandı. Elde edilen sekans bilgileri Bioedit Alignment Sequence Editor ile incelendi (Hall, 1999). Tespit edilen sekanslar, web tabanlı BLAST programı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) kullanılarak GenBank'tan elde edilen benzer sekanslarla karşılaştırıldı.

BULGULAR

Toplam 90 sığra ait örneklerin kültür ile incelenmesi sonucunda, 35 (%38,8) örnekte makroskobik ve mikroskobik olarak *T. verrucosum* olarak tanımlanan üremeler görüldü (Tablo 1).

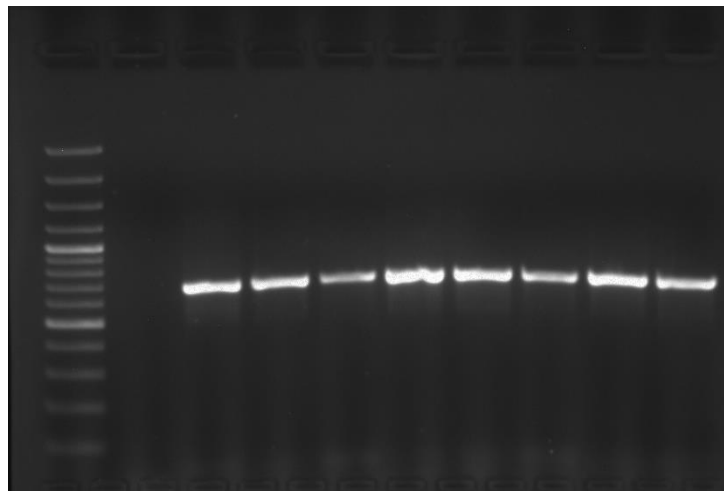
Tablo 1. İncelenen örneklerin yaş gruplarına ve bölgelere göre dağılımı.

Table 1. Distribution of the studied samples by age groups and regions.

Örnek alınan bölge	Örnek alınan işletme sayısı	Yaş grupları						Toplam	
		0-6 ay		6 ay- 1 yaş		1 yaş ve üzeri		Alınan örnek sayısı	Pozitif örnek sayısı
		Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı	Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı	Alınan Örnek Sayısı	Pozitif Bulan Örnek Sayısı		
Suruç	2	10	8	10	9	-	-	20	17
Bozova	1			2	1	12	1	14	2
Haliliye	4	19	4	4	1	-	-	23	5
Eyyübiye	4	11	4	8	5	14	2	33	11
Toplam	11	40	16	24	16	26	3	90	35

Bu örneklerin ITS bölgelerinin PCR ile amplifikasyonu sonucunda 622 bp'de bantlar görüldü (Şekil 1). PCR ürünlerinin sekanslanması sonucunda

izole edilen bütün suşların *T. verrucosum* olduğu saptandı.

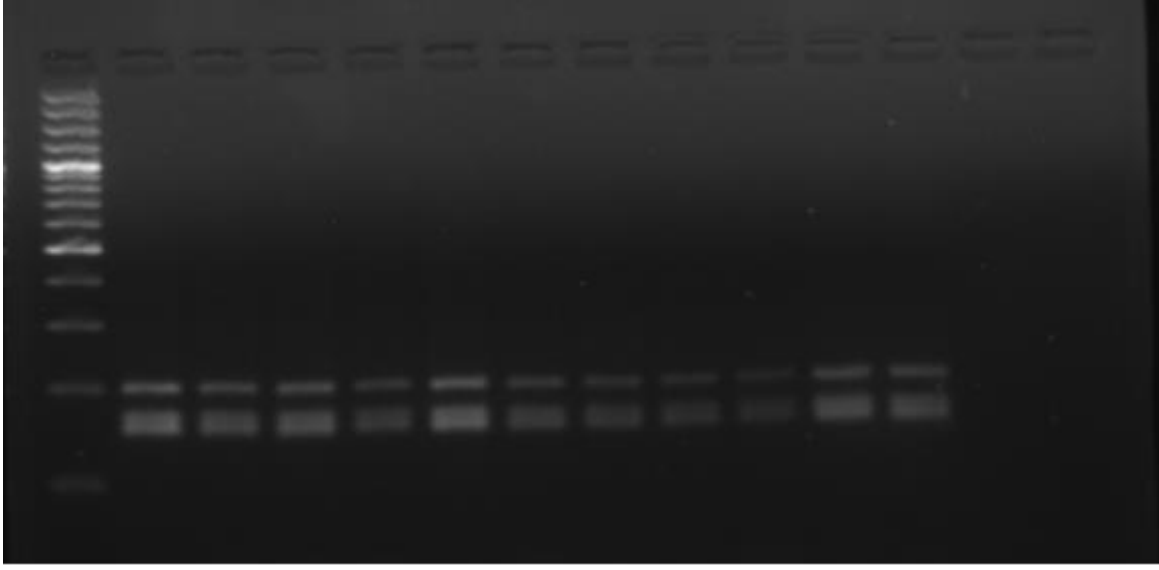


Şekil 1: *T. verrucosum* suşlarının PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşları, 1,2,3,4,5,6,7,8 (622 bp)

Figure 1: Agarose gel view of PCR products of *T. verrucosum* strains. M: marker *T. verrucosum* strains, 1,2,3,4,5,6,7,8 (622 bp)

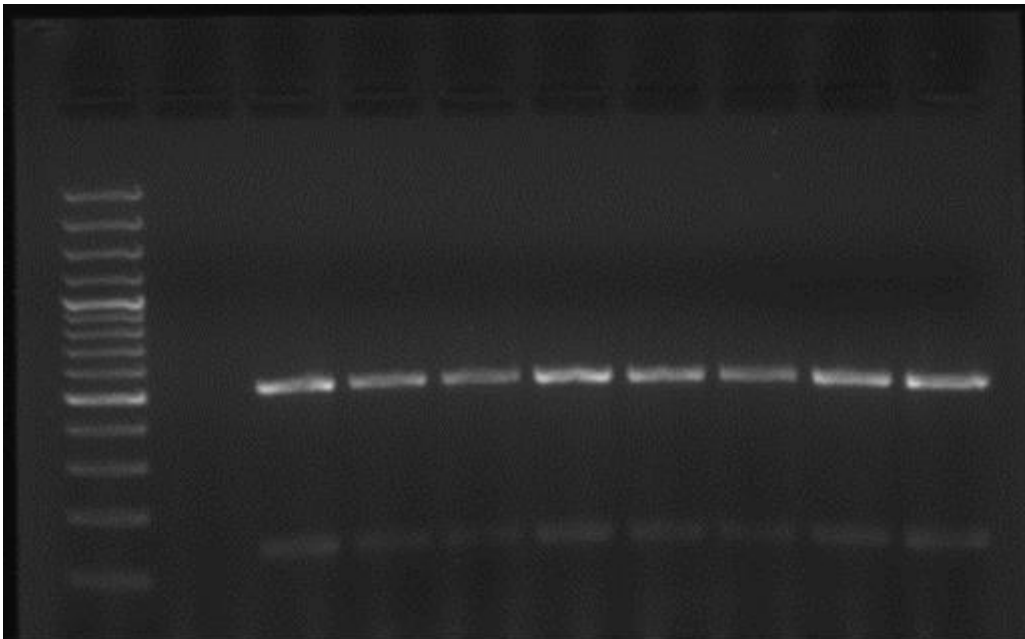
PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucunda HinfI (200-159-145 bp) ve MvaI (518-140 bp) enzimi kullanılarak

yapılan kesimlerde ise tek bir profil görüldü. (Şekil 2-3).



Şekil 2: HinfI enzimi kesim sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşlarının RFLP profilleri 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 (200-159-145 bp)

Figure 2: HinfI enzyme agarose gel electrophoresis image after cutting. M: marker RFLP profiles of *T. verrucosum* strains 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11 (200-159-145 bp)



Şekil 3: MvaI enzimi kesim sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. M: marker *T. verrucosum* suşlarının RFLP profilleri 1,2,3,4,5,6,7,8 (518-140 bp)

Figure 3: Agarose gel electrophoresis image after cutting MvaI enzyme. M: marker RFLP profiles of *T. verrucosum* strains 1,2,3,4,5,6,7,8 (518-140 bp)

TARTIŞMA

Sığırlardan genellikle *T. verrucosum* izole edilmektedir. Sığırlardan *T. verrucosum* dışında *M. gypsum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* ve *T. simii* izole edildiği bildirilmiştir (Mitra ve ark. 1998). Bu çalışmada dermatofitoz şüpheli 90 sığırın 35 (%38,8)'inden *T. verrucosum* izole edilmiştir. İran'da Khosravi ve Mahmoudi (2003) deri lezyonu olan sığırların %85'inden *T. verrucosum*, %15'inden *T. mentagrophytes* izole etmişlerdir. Abou-Eisha ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada kültürel olarak pozitif olan dermatofit izolatlarından, sığırların 54 (%75)'ünden *T. verrucosum* izole etmişlerdir. Yıldırım ve ark (2010)'ları Kırıkkale bölgesinde yaptıkları çalışmada klinik olarak dermatofitoz lezyonları gösteren 50 ineğin %44'ünden *T. verrucosum* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Aghamirian ve Ghiasian (2011) yaptıkları çalışmada 380 sığırın 352 (%92,6)'sinden, Papini ve ark. (2009), 294 sığırdan %87,7 oranında *T. verrucosum* izole etdiklerini bildirmişlerdir. Abd-Elmegeed ve ark. (2020)'nın Mısır'da yaptıkları çalışmada, *T. verrucosum*'un (%25,6) oranında en sık saptanan dermatofit türü olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda izolasyon oranı Yıldırım ve ark (2010) 'nın bulgularına benzer görülürken Abd-Elmegeed ve ark. (2020)'nın bulgularından yüksek, diğer çalışmalardan ise düşük olarak bulunmuştur. Bunun bölgesel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmekle beraber en sık izole edilen etkenin *T. verrucosum* olması diğer çalışmalara benzer olarak görülmüştür.

Bu çalışmada 35 suşun PCR ürünlerinin RFLP analizi sonucunda Hinfl (200-159-145 bp) ve MvaI (518-140 bp) enzimi ile kesim sonrasında tek bir profil görüldü. Neji ve ark. (2016), çalışmalarında Hinfl enzimiyle 3 profil, MvaI enzimiyle 2 profil elde etmişlerdir. Hinfl ile A [372-159-145 bp] (79.4%), B [372-304-159-145 bp] (14.7%) ve C [306-200-164 bp] (5.9%), MvaI enzimi ile 2 (I [406-125-89-50 bp] (94.1%) ve (II [518-140 bp] (5.9%) profil elde etmişlerdir. Ancak bu profillerden sadece bir tanesinin çok yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Jha ve ark (2012), 11 *T. verrucosum* suşunu HaeIII enzimini kullanarak PCR-RFLP ile inceledikleri çalışmada tek profil elde etmişlerdir. Mirzahoseini ve ark (2009), PCR-RFLP kullanarak dermatofitlerin hızlı identifikasyonlarını amaçladıkları çalışmada 6 dermatofit türünü (*T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum*, *T. tonsurans*, *Microsporum canis* ve *Epidermophyton floccosum*) MvaI, Hinfl and HaeIII enzimleri ile kesimlerini gerçekleştirmişlerdir. Kesim sonucunda tek profil elde ederek PCR-RFLP'nin özellikle tür ya da cins düzeyinde identifikasyon için yararlı bir araç olduğunu belirtmişlerdir. ITS bölgesinin MvaI enzimi kullanılarak kesiminin yapıldığı başka bir çalışmada 2 RFLP profili elde edilmiştir. Birinci patern'de iki fragmentten oluşurken

(380 bp-220 bp) ikinci profil kesilmeden tek fragmentten (600 bp) oluşmuştur (Dalis ve ark. 2018). Bu çalışmada tek profil elde edilmesi Jha ve ark (2012) ile Mirzahoseini ve ark (2009)'nın bulgularına benzer görülürken diğer çalışmalardan farklı olarak görülmüştür. Bunun nedeninin örneklemenin küçük bir alanda (Şanlıurfa) yapılmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

SONUÇ

Sonuç olarak, izole edilen suşların tek bir profile sahip olduğu ve *T. verrucosum* suşlarının tiplendirilmesinde ITS-RFLP'nin kullanılabilir ve tekrarlanabilir bir test olduğu sonucuna varıldı. Daha sonraki çalışmalarda daha geniş bir alandan örnek alınarak PCR-RFLP tiplendirilmesinin yapılmasının yararlı olacağı sonucuna varıldı

Proje Destek Bilgileri: Bu çalışma, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (HÜBAK) tarafından 17057 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Abd-Elmegeed M, El-Mekkawi MF, El-Diasty EM, Fawzi EM.** Dermatophytosis among Ruminants in Egypt: The Infection Rate, Identification and Comparison between Microscopic, Cultural and Molecular Methods. Zagazig Veterinary Journal. 2020; 48(2): 116-127.
- Abou-Eisha A, Sobih M, Fadel H, Elmahallawy H.** Dermatophytes in animals and their zoonotic importance in Suez canal area. Suez Canal Vet Med J. 2008; 13(2): 625-642.
- Aghamirian MR, Ghiasian SAJM.** Dermatophytes as a cause of epizoonoses in dairy cattle and humans in Iran. Epidemiological and clinical aspects. 2011; 54(4): e52-e6.
- Arda M.** Mikoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi. Ankara. 1980 Pp: 15-23.
- Dalis JS, Kazeem HM, Kwaga JK, Kwanashie CN, Yakubu B, Owolodun OA, Jambol AR.** Molecular characterization of dermatophytes isolated from cattle in Plateau State, Nigeria. Vet microbiol. 2018; 219: 212-218.
- Hall TA.** BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series 1999; 41: 95-98.
- Hsiao CR, Huang L, Bouchara JP, Barton R, Li HC, Chang TC.** Identification of medically important molds by an oligonucleotide array. J Clin Microbiol. 2005; 43: 3760-3768.

- Jackson CJ, Barton, RC, Evans EG.** Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal-DNA intergenic spacer regions. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 31: 931-936.
- Jha BK, Murthy SM, Devi NL.** Molecular identification of dermatophytosis by polymerase chain reaction (PCR) and detection of source of infection by restricted fragment length polymorphism (RFLP). *Journal of College of Medical Sciences. Nepal.* 2012; 8(4): 7-15.
- Kac G.** Molecular approaches to the study of dermatophytes. *Med. Mycol.* 2000; 38: 329-336.
- Khosravi AR, Mahmoudi M.** Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. *Mycoses.* 2003; 46: 222-225.
- Larone, D.H.** Medically Important Fungi, In: *A Guide to Identification*, 4th Ed., Washington, ASM press. 2002.
- Liu D, Coloe S, Baird R, Pedersen J.** Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. *Journal of clinical microbiology.* 2000; 38(1): 471-471.
- Mirzahoseini H, Omidinia E, Shams-Ghahfarokhi M, Sadeghi G, Razzaghi-Abyaneh M.** Application of PCR-RFLP to rapid identification of the main pathogenic dermatophytes from clinical specimens. *Iranian Journal of Public Health.* 2009; 18-24.
- Mitra SK, Sikdar A, Das P.** Dermatophytes isolated from selected ruminants in India. *Mycopathologia.* 1998; 142: 13-16.
- Mochizuki T, Kawasaki M, Ishizaki H, Makimura K.** Identification of several clinical isolates of dermatophytes based on the nucleotide sequence of internal transcribed spacer 1 (ITS 1) in nuclear ribosomal DNA. *J. Derm.* 1999; 26: 276-281.
- Neji S, Trabelsi H, Hadrach I, Cheikhrouhou F, Sellami H, Makni F, Ayadi A.** Molecular characterization of strains of the *Trichophyton verrucosum* complex from Tunisia. *Medical Mycology.* 2016; 1-7.
- Papini R, Nardoni S, Fanelli A, Mancianti F.** High Infection Rate of *Trichophyton verrucosum* in Calves from Central Italy. *Zoonoses Public Health.* 2009; 56: 59-64.
- Thomas GM, Xu J.** Molecular methods to identify pathogenic fungi In: *Pathogenic Fungi in Humans and Animals*. Ed.: D.H. Howard, Marcel Dekker, NY. 2002 p: 677-702
- Yildirim M, Cinar M, Ocal N, Yagci BB, Askar S.** Prevalence of Clinical Dermatophytosis and Oxidative Stress in Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advance.* 2010; 9(14): 1978-1982.
- White T, Burns T, Lee S, Taylor J.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: *PCR protocols, A guide to methods and applications*. Ed.: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White. Academic Press, Inc., San Diego, Calif. 1990 p. 315-322

The Effects of Supplementing Different Vegetable Oils in the Diet of Quails on Growth, Carcass Traits and Serum Biochemical Parameters

Zeynep KARA¹, Tuba BÜLBÜL^{2*}

¹*Veterinary, Isparta, Turkey*

²*Muğla Sıtkı Koçman University, Faculty of Milas Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, Muğla, Turkey*

ABSTRACT

A six weeks long study trial was conducted on Japanese quails to evaluate the growth performance, carcass traits, some blood parameters and oxidative status when different vegetable oils were supplemented through diet. A total of 400, 3 days old, Japanese quails, were randomly divided into four different groups and each consisting of 100 quails. Each of the main group was further divided into five replicates and each replicate was composed of 20 quails. Soybean oil, sunflower oil, safflower oil and olive oil was supplemented to experimental diets separately at level of 3%. The results showed that there were no changes in terms of growth performance and carcass traits as well as alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total protein, triglyceride and cholesterol levels in all experimental groups with soybean oil, sunflower oil, safflower oil and olive oil supplementation ($p>0.05$). However it was observed that, the serum malondialdehyde level was decreased, whereas serum antioxidant activity level was significantly increased ($p<0.05$) in the safflower oil treatment group. From the results, it could be concluded that supplementation of soybean, sunflower, safflower and olive oil in quail diets had neither harmful nor beneficial effects on the growth performance, carcass traits, serum biochemical parameters and oxidation status of breast meat. Furthermore, it can also be stated that prevention of serum lipid oxidation might be more effective by supplementation of safflower oil in quails.

Keywords: Growth performance, oxidation, quail, vegetable oil.

Bıldırcın Rasyonlarına Katılan Farklı Yağ Kaynaklarının Büyüme, Karkas Özellikleri ve Serum Biyokimyasal Parametrelere Etkisi

ÖZ

Altı hafta sürdürülen çalışma farklı bitkisel yağların rasyonlara katılmasının Japon bıldırcınlarında büyüme performansı, karkas özellikleri, bazı kan parametreleri ve oksidatif durum üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapıldı. Toplam 400 Japon bıldırcını, her biri üç günlük ve 100 adetten oluşan dört farklı gruba ayrıldı. Her bir grup da başlıca 20 bıldırcın içeren beş alt gruba bölündü. Deneme rasyonlarına % 3 düzeyinde soya yağı, ayçiçeği yağı, aspir yağı ve zeytin yağı ayrı olarak katıldı. Araştırmada soya yağı, ayçiçeği yağı, aspir yağı ve zeytin yağı grupları arasında büyüme performansı, karkas parametreleri ile alkalik fosfataz, alanin aminotransferaz, aspartat aminotransferaz, total protein, trigliserit ve kolesterol düzeyleri üzerinde istatistik fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Buna karşın aspir yağı grupta serum malondialdehit düzeyinin azalırken, serum antioksidan aktivite düzeyinin arttığı belirlendi ($p<0.05$). Araştırmada bıldırcın rasyonlarına soya, ayçiçeği, aspir ve zeytin yağı katımının büyüme performansı, karkas özellikleri, serum biyokimyasal parametreler ve göğüs etindeki antioksidan duruma herhangi bir zarar verici ya da fayda sağlayıcı bir etkisi olmadığı sonucuna varılabilir. Ayrıca, bıldırcınlarda serum lipit oksidasyonunun önlenmesinde aspir yağı katımının daha etkili olabileceği de ifade edilebilir.

Anahtar Kelimeler: Bıldırcın, bitkisel yağ, büyüme performansı, oksidasyon.

To cite this article: Bülbül T. Kara Z. The Effects of Supplementing Different Vegetable Oils in the Diet of Quails on Growth, Carcass Traits and Serum Biochemical Parameters. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):57-64

Submission: 21.10.2020 **Accepted:** 27.01.2021 **Published Online:** 19.02.2021

ORCID ID; Z.K: 0000-0002-7878-6360, T.B: 0000-0002-8610-362X

*Corresponding author e-mail: tubabulbul@mu.edu.tr

INTRODUCTION

The vegetable oils from various sources are added to different feedstuff of poultry birds to meet their energy deficiencies. In this regard soybean oil, sunflower and canola oil are among some of the important vegetable oils used in poultry production to coup up the energy deficiencies (Ahiwe et al. 2018). In this context, a number of research trials have been conducted on the use of oils from different sources in poultry (Jalali et al. 2015). However the findings of such studies were contradictory in a way that the supplementation proved to be effective in some trials whereas didn't prove to be effective in some other research trials. In a trial conducted by (Erener et al. 2007) it was reported that the soybean oil, hazelnut oil supplementation of feedstuff had no statistically significant effects on body weight (BW), feed intake (FI), and feed conversion ratio (FCR) whereas similar results were obtained when feed was supplemented with sunflower oil, fish oil (Maniila et al. 1999). In another study which the diet of quails was supplemented with 3% linseed oil, sunflower oil and olive oil, similar findings were reported that the supplementation did not affect the performance parameters including BW, FI, FCR and carcass yield (El-Yamany et al. 2008).

The quail meat may be considered as a competitive source against the broiler meat. According to some studies, it is believed that quail meat is nearly a chicken and even better than it. Quail meat includes high protein, polyunsaturated fatty acids and essential trace minerals and fat. Because of high metabolic activity in this bird, the amount of glycogen stored in muscles increased, resulting in high quality (Boni et al. 2010). Lipid oxidation is a deteriorating process that leads to the development of various oxidants formed in double bonds in unsaturated fatty acids and can lead to formation of degradation products such as acids, ketones, alcohols and aldehydes. The fact that poultry meat is rich in long chain polyunsaturated fatty acids; increases the sensitivity of this product and makes it more prone to lipid oxidation. Oxidation, which results during processing, cooking and refrigeration of meat, adversely affects its taste, smell, nutritional value and shelf life. Besides, further oxidative deterioration leads to the formation of short-chain aldehydes,

ketones and other oxidative compounds, impairing the overall quality of the product (Domínguez et al. 2019).

Although, there are many similar studies with our study on the use of different vegetable oil at various levels as energy sources in mixed feeds of poultry (Balevi and Coskun 2000; Crespo and Esteve-Garcia 2001), as far as we know, there are no studies conducted with the same oil sources in quail diets during their growing period. In this context, the effects of different vegetable oil sources on growth performance, carcass yield, serum biochemical parameters and oxidative status in quails during the growing period was evaluated.

MATERIAL and METHODS

Animals, Diets and Experimental Design

This study was conducted at the Animal Research Center of Afyonkarahisar University, Turkey, following the approval of the ethical committee (AKUHADYEK-303-13). A total of 400, three-day-old, Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) were selected for the research trial. The birds were randomly divided into four groups, each containing 100 quails. Each group was sub-divided into five replicates containing 20 quails each. The quails were weighed individually and placed in 44×30×20 cm cages. The feed ingredients including corn, sunflower meal, soybean meal, wheat, and other feedstuff were obtained from Tinaztepe Feed Factory (Afyonkarahisar, TURKEY). The diets with corn, soybean meal, sunflower meal, wheat and vegetable oils were analyzed and formulated to meet the nutritional requirements according to the recommendations of NRC (1994). Sunflower, safflower, soybean and olive oil were supplemented to the diet of each group separately at the level of 3%. Automatic nipple water system was set up in each cage while. Feed and water were given daily ad libitum. The chemical composition of the diet is shown in Table 1.

The nutrient content of the diet was determined according to the AOAC (2010). The metabolizable energy (ME) level of the diet was calculated according to Leeson and Summers (2001) (Table 1). Fatty acid composition of the vegetable oils was analyzed by GC/MS method in Orucoglu Oil Factory (Table 2).
 $ME, \text{kcal/kg} = 53 + 38 [(crude \text{ protein, \%}) + (2.25 \times crude \text{ fat, \%}) + (1.1 \times starch, \%)] + (1.05 \times sugar, \%)]$.

Table 1. Ingredients and chemical compositions of the diets used in the study (%).

Ingredients	%
Corn	34.00
Wheat	18.20
Soybean meal	26.00
Sunflower meal	16.00
Vegetable oil	3.00
Limestone	1.30
Dicalcium phosphate	0.80
Salt	0.30
L-Lysine	0.15
Vitamin premix*	0.15
Mineral premix**	0.10
Chemical composition (analyzed)	
Dry matter, %	90.21
Crude ash, %	6.61
Crude protein, %	23.82
Crude fat, %	6.27
Crude fiber, %	6.9
Chemical composition (calculated)	
Nitrogen free extract, %	46.61
Calcium, %	0.86
Phosphorus, %	0.34
Metabolizable energy, kcal kg ⁻¹	2985

*Vitamin premix: Composition per 2.5 kg; A vitamini 12.000.000 IU; D3 vitamini 2.000.000 IU; E vitamini 35.000 mg g; K3 vitamini 4.000 mg; B1 vitamini 3.000 mg; B2 vitamini 7.000 mg; niasin 20.000 mg; kalsiyum D-pantotenat 10.000 mg; B6 vitamini 5.000 mg; B12 vitamini 15 mg, 8 g; folic acid 1.000 mg; D-biotin 45 mg; C vitamini 50.000 mg, choline chloride 125.000 mg; canthaxanthin 2.500 mg; apo carotenoic acid ester 500 mg.

**Mineral premix: Composition per 1 kg; Mn 80.000 mg; Fe 60.000 mg; Zn 60.000 mg; Cu 5.000 mg; Co 200 mg; I 1.000 mg; Se 150 mg

Table 2. Fatty acid composition of the vegetable oils used in the study (%).

Fatty acids	Soybean oil	Sunflower oil	Safflower oil	Olive oil
Myristic acid (14:0)	0.05	0.08	6.65	0.02
Palmitic acid (16:0)	10.59	6.39	0.12	12.36
Stearic acid (18:0)	4.65	3.26	2.71	2.87
Oleic acid (18:1)	24.87	31.96	11.91	72.61
Linoleic acid (18:2 n-6)	52.22	56.96	77.37	9.29
α -Linolenic acid (18:3 n-3)	6.41	0.08	0.11	0.63
Arachidonic acid (20:0)	0.40	0.23	0.29	0.48
Eicosenoic acid (20:1)	0.23	0.19	0.19	0.33
Behenic acid (22:0)	0.35	0.52	0.19	0.10
Palmitoleic acid (16:1)	0.10	0.15	0.11	0.95
Margaric acid (17:0)	0.10	0.04	0.05	0.13
Heptadesenoic acid (17:1)	0.06	0.04	0.04	0.18
Erucic acid (22:1)	-	-	0.18	0.02
Lignoceric acid (24:0)	0.08	0.09	0.017	-
Total saturated fatty acids	16.12	10.61	10.08	15.96
Total unsaturated fatty acids	83.89	89.38	89.91	84.01
Mono unsaturated fatty acids	25.26	32.34	12.43	74.09
Poly unsaturated fatty acids	58.63	57.04	77.48	9.92
Omega-6 fatty acid	52.22	56.96	77.37	9.29
Omega-3 fatty acid	6.41	0.08	0.11	0.63
Omega-6/omega-3 fatty acid	8.15	712	703.4	14.75

Fattening Performance Traits

The quails were weighed individually on weekly basis. Feed intake was measured for two times in a week among the groups. Feed conversion ratio was calculated biweekly by calculating the amount of feed consumed for BW gain in kg.

Carcass Quality Traits

At the end of trial, from each group, 5 male and 5 female quails were randomly selected and slaughtered. The slaughtered birds were opened, internal organs were removed, body fat and feathers were also removed and carcass weight was calculated for each bird. The weights of some internal organs were divided into body weights before slaughter, and relative organ weights were calculated. The cold carcass weight was determined after the carcasses were stored at +4 °C for 18 hours. The hot and cold carcass yields were calculated by dividing the weight of the hot and cold carcasses by pre-slaughter weights.

Collection and Storage of Serum and Breast Meat Samples

After slaughtering the blood was taken from each quail and taken in test tubes having anticoagulant and kept refrigerated for 24 hours at 4 °C. Subsequently, the blood was centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes to obtain serum. The serum samples were stored at -18 °C. Besides, 10 samples of breast meat from each group were weighed to determine malondialdehyde (MDA) level.

Determination of Serum Biochemical Parameters

In the stored blood samples taken from quails at the end of the study, serum alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total protein, triglyceride and cholesterol levels were measured using an autoanalyzer (ILab 300 Plus) with commercial kits (Instrumentation Laboratory Company, Milan, Italy). All procedures were conducted in the Pharmacology Department of the Faculty of Veterinary Medicine of the Selcuk University.

Determining the Serum Antioxidant Activity and Breast Meat MDA Levels

Serum MDA level was determined using the double boiling of free radicals MDA resulting from free radicals reported by Draper and Hadley (1990). Serum antioxidant activity (AOA) level was determined calorimetrically in the serum using the method described by Koracevic et al. (2001). The MDA level in breast meat was determined by the method of Botsoglou et al. (2002).

Statistical Analysis

The Variance Analysis Method was used to evaluate differences between the mean values of the groups in the study, and the Tukey test was used to estimate the significance of differences between the groups (SPSS 13.0, Inc., Chicago, IL, USA). $p < 0.05$ value was considered statistically significant for every statistical analysis.

RESULTS

The fatty acid composition of the vegetable oil samples used in the study are presented in Table 2. The vegetable oil supplementation didn't statistically affect the performance parameters e.g. FCR, FI, BW, body weights ($p > 0.05$; Table 3).

Hot and cold carcass weights and relative weights of some organs and abdominal fat were not affected by the supplementation of vegetable oils ($p > 0.05$; Table 4).

The supplementation had no any statistical effect on serum ALP, ALT, AST, total protein, triglyceride, and cholesterol levels among the treatment groups ($p > 0.05$; Table 5). Serum MDA level was observed to be decreased ($p < 0.05$) in the safflower oil-supplemented group, whereas serum AOA level increased ($p < 0.05$) in the same group compared with soybean, sunflower, safflower and olive oil supplementation groups. No significant difference was observed ($p > 0.05$) among the groups in term of MDA level of breast meat (Table 6).

Table 3. The effects of dietary vegetable oils supplementation on fattening performance in quails.

Parameters	Soybean oil	Sunflower oil	Safflower oil	Olive oil	P
Initial body weight (g)	10.98±0.41	10.74±0.19	10.84±0.36	10.48±0.18	0.707
Final body weight (g)	191.15±3.23	188.41±3.29	187.32±3.15	191.44±2.22	0.717
Body weight gain (g)	180.17±3.16	177.67±3.22	176.48±3.07	180.96±2.26	0.686
Feed intake (g)	715.18±12.08	694.36±18.59	693.89±16.66	727.51±25.10	0.523
Feed conversion ratio (g feed/g)	3.97±0.03	3.90±0.07	3.93±0.03	4.01±0.09	0.647

Statistically not significant ($p > 0.05$).

Table 4. The effects of dietary vegetable oils supplementation on carcass weights (g), carcass yields (%), relative inert organ weights and abdominal fat (%) in quails.

Parameters	Soybean oil	Sunflower oil	Safflower oil	Olive oil	P
Hot carcass weight	121.29±5.10	120.22±4.73	120.94±3.02	124.36±4.20	0.271
Cold carcass weight	115.99±8.16	114.57±4.64	112.28±3.24	115.23±4.22	0.924
Hot carcass yield	72.13±3.32	66.83±0.96	70.10±1.14	68.81±1.08	0.467
Cold carcass yield	64.09±3.18	64.49±0.99	65.65±0.96	65.16±1.01	0.892
Liver	2.31±0.184	2.53±0.13	2.28±0.172	2.31±0.13	0.654
Heart	0.936±0.048	0.858±0.02	0.949±0.027	0.853±0.015	0.076
Spleen	0.112±0.034	0.142±0.034	0.086±0.012	0.145±0.045	0.856
Gizzard	1.99±0.066	2.18±0.13	2.05±0.038	1.77±0.22	0.230
Proventriculus	0.411±0.016	0.467±0.02	0.436±0.020	0.391±0.02	0.124
Abdominal fat	1.39±0.21	1.43±0.23	1.56±0.26	1.54±0.18	0.563

Statistically not significant ($p>0.05$); n=5.

Table 5. The effects of dietary vegetable oils supplementation on serum ALP (IU/L), ALT (IU/L), AST (IU/L), total protein (g/dL), triglyceride (mg/dL) and cholesterol (mg/dL) levels in quails.

Parameters	Soybean oil	Sunflower oil	Safflower oil	Olive oil	P
ALP	992.42±33.23	1057.88±45.84	990.12±45.39	1040.22±62.40	0.706
ALT	15.34±1.96	11.77±2.20	11.33±0.91	13.11±1.76	0.454
AST	274.28±10.08	260.44±42.51	273.37±21.80	250.88±23.08	0.929
Total protein	8.34±0.79	9.27±1.00	9.34±1.17	8.00±1.61	0.812
Triglyceride	624.14±39.80	873.33±107.14	735.87±58.89	730.77±78.47	0.212
Cholesterol	352.28±13.87	399.88±34.65	340.28±15.58	332.55±14.54	0.158

Statistically not significant ($p>0.05$); n=5.

ALP: Alkaline phosphatase, ALT: Alanine aminotransferase, AST: Aspartate aminotransferase

Table 6. The effects of dietary vegetable oils supplementation on serum MDA (nmol/L), breast meat MDA (nmol/L) and serum AOA (mmol/L) levels in quails.

Parameters	Soybean oil	Sunflower oil	Safflower oil	Olive oil	P
Serum MDA	2.03±0.50 ^{ab}	2.42±0.92 ^a	1.67±0.78 ^b	1.88±0.74 ^{ab}	0.039*
Breast meat MDA	6.48±0.16	7.64±0.25	6.04±0.133	7.55±0.13	0.356
Serum AOA	7.55±0.33 ^b	7.44±0.24 ^b	8.98±0.26 ^a	8.17±0.33 ^{ab}	0.02*

a,b: Different letters in the same line indicate statistically significant. (*): $p<0.05$; n=5.

MDA: Malondialdehyde, AOA: Antioxidant activity

DISCUSSION and CONCLUSION

The vegetable oils used in this study trial were rich in unsaturated fatty acids (average 86.8%). In addition, it was observed that soybean, sunflower and safflower oils were rich in linoleic acid (52.22%, 56.96% and 77.37% respectively) from polyunsaturated fatty acids. On the other hand, olive oil was rich in oleic acid (72.61), a monounsaturated fatty acid (Table 2). Fatty acid profile obtained in this study was found to be consistent with some previous findings using these oils (Balevi and Coskun 2000; Açıkgöz et al. 2003). In previous studies, it has been noted that the fatty acid composition of the oils used was considerably effective in determining the fatty acid profile of the obtained product (Lopez-Ferrer et al. 1999; Sanz 1999).

However, it has been reported that supplementing fat sources rich in polyunsaturated fatty acids to poultry diets increases polyunsaturated fatty acids in meat (Pinchasov and Nir 1992). Similarly, Scaife et al. (1994) observed a significant increase in the amounts of breast meat linoleic, eicosadienoic and arachidonic acid in broilers, which were fed soybean oil supplemented diets. Moreover, some studies reported that the supplementation of sunflower oil to broiler diets increased linoleic acid levels, in breast meat (Newman et al. 2002), leg and breast meat (Crespo and Esteve-Garcia 2001). In another study, it was reported that soybean oil supplementation in broiler diets increased linoleic acid levels in leg skin, breast meat and abdominal fat (Azman et al. 2005). In this study although not evaluated, yet it was assumed that the oils used in diets were rich in fatty acids such as high omega-6 or oleic acid, suggesting that these oils could be used as a suitable source of essential fatty acids for quails.

The results obtained revealed that the supplementation of vegetable oils did not affect the BW, BW gain, FI and FCR in quail ($p > 0.05$, Table 3). Similarly, El-Yamany (2008) demonstrated that supplementation of linseed, sunflower and olive oil to growing quail diets did not affect BW, FI and FCR. The results of the present study were similar to the findings of Midilli et al. (2009). Results of the current study showed that the carcass weights and yields, relative weight of some organs and abdominal fat were not affected by dietary vegetable supplementation in quails ($p > 0.05$, Table 4) and the results obtained by El-Yamany (2008) were aligned to those obtained in our study trial.

The presence of liver enzymes e.g. ALT, AST, ALP, etc, in blood, heart muscles and skeletal muscles indicates the dysfunction of liver and hepatobiliary obstruction whereas on the other hand the supplementation of vegetable oils plays a pivotal role in regulating the liver function (Kerr 2008; Senanayake et al. 2015). In this study, it is observed that vegetable oil (rich in unsaturated fatty acids)

supplementation didn't affect the liver enzymes so it concluded that the vegetable oils used in our trial didn't affect the liver of quails (Mahmoud et al. 2012). In this context, the current study suggests that vegetable oils added to quail rations did not produce any change in the levels of enzymes used in determination of liver functions ($p > 0.05$, Table 4). Similar to liver enzymes, there was no difference in serum triglyceride and cholesterol levels among groups, indicating that four different oil sources did not alter serum lipid profile ($p > 0.05$, Table 5). Lee et al. (2000) demonstrated that plasma triglyceride levels were significantly reduced in humans fed with olive oil ($p < 0.05$); Baba et al. (2000) observed that canola, olive, soybean and sesame oil did not cause differences in cholesterol levels in rats, whereas triglyceride levels decreased in the groups which were given canola and soybean oil. In addition, it is reported that oils containing polyunsaturated fatty acids such as omega-3 and omega-6 (fish oil, sunflower oil, corn oil) are more effective in lowering cholesterol levels than oils containing monounsaturated fatty acids (olive oil, canola oil) (Mohamed et al. 2002). It has been shown in this study, that omega-3 fatty acid supplementation decrease plasma cholesterol levels (Atakisi et al. 2009).

Poultry meat is an animal product with a high level of unsaturated fatty acids, especially polyunsaturated fatty acids (Chmiel et al. 2019). Therefore, enrichment of meat by these fatty acids reduces resistance to lipid oxidation (Cortinas et al. 2005). Lipid peroxidation is a highly deleterious chain reaction for all biomolecules. The unsaturated bonds of the fatty acids in the membrane can easily react with free radicals, leading to the formation of peroxidation products. The formation of MDA, which is the most important indicator of lipid peroxidation, leads to the deterioration of membrane structure, producing reactive aldehydes and damaging other cell components (Domínguez et al. 2019). Along with lipid oxidation, sensory properties of meat are deteriorated, nutritional values are lost and shelf life is shortened. As a result of advanced and severe oxidative degradation, the quality of the product is also adversely affected, resulting in the formation of short chain aldehydes, ketones and other oxidative compounds (Botsoglou et al. 2002).

Many studies on this subject have indicated that lipid oxidation in poultry meat (Boni et al. 2010; Biricik et al. 2012) and serum (Bulbul et al. 2014, Yesilbag et al. 2012) may be prevented by the supplementation of aromatic oils or extracts to the diet. It is stated that the antioxidant properties of aromatic plants are derived from phenolic compounds which are responsible for scavenging free radicals in the structures and for creating compounds with metal ions by reducing the formation of singlet oxygen (Domínguez et al. 2019). In addition to this, it has

been shown that vegetable oils can prevent oxidation in meat and the sensitivity of chicken meat to oxidation enriched with unsaturated fatty acids can be eliminated especially with the use of vitamin E, which is a natural antioxidant (Lopez-Ferrer et al. 1999). Serum MDA level, the final product of lipid peroxidation, was found to be lowest in the group fed with safflower oil ($p < 0.05$; Table 6). Serum AOA level was found to have increased in the same group compared to groups containing soybean and sunflower oils ($p < 0.05$; Table 6). It is thought that the strong antioxidant effect of safflower oil could be due to the high level of vitamin E contained in this oil and the polyphenolic compounds in its seed.

According to the results, it can be concluded that the supplementation of soybean, sunflower, safflower and olive oil to quail diets did not affect growth performance, carcass traits, liver enzymes, total protein, lipid profile and breast meat MDA. When soybean, sunflower, safflower and olive oils used in the research are compared, safflower oil is recommended in case of any stress; otherwise, the cheaper one should be preferred in quail diets.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was summarized from the Master's Thesis named as 'The Effects of Different Oil Sources Supplementation in Quail Diets on Fattening Performance, Carcass Traits and Some Blood Parameters' in Afyonkocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, Afyonkarahisar, Turkey. We would like to acknowledge Shah Nawaz for editing and proof reading this manuscript.

Financial Support: This research received no grant from any funding agency/sector.

Ethics Committee Information: This study was conducted at the Animal Research Center of Afyonkarahisar University, Turkey, following the approval of the ethical committee (AKUHADYEK-303-13).

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Açıkgöz Z, Altan Ö, Bayraktar H. Karma yeme asit yağ ilavesinin etlik piliç performansı üzerine etkileri. *Hayvansal Üretim*, 2003; 44:1-8.

Ahiwe EU, Omede AA, Abdallah MB, Iji PA. Managing Dietary Energy Intake by Broiler Chickens to Reduce Production Costs and

Improve Product Quality. *Animal Husbandry and Nutrition*, 2018; 115-145.

AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. AOAC International, 2000; Maryland, USA.

Atakisi E, Atakisi O, Yaman H, Arslan I. Omega-3 fatty acid application reduces yolk and plasma cholesterol levels in japanese quails. *Food Chem Toxicol.* 2009; 47:2590-2593.

Azman MA, Çerçi IH, Birben N. Effects of various dietary fat sources on performance and body fatty acid composition of broiler chickens. *Turk J Vet Anim Sci.* 2005; 29:811-819.

Baba NH, Ghossoub Z, Habbal Z. Differential effects of dietary oils on plasma lipids, lipid peroxidation and adipose tissue lipoprotein lipase activity in rats. *Nutr Res*, 2000; 20:1113-1123.

Balevi T, Coskun B. Effects of some oils used in broiler rations on performance and fatty acid compositions in abdominal fat. *Revue Med Vet.* 2000; 151:937-944.

Biricik H, Yesilbag D, Gezen S, Bulbul T. Effects of dietary myrtle oil (*Myrtus Communis L.*) supplementation on growth performance, meat oxidative stability, meat quality and erythrocyte parameters in quails. *Revue Med Vet.* 2012; 163:134-138.

Boni I, Nurul H, Noryati I. Comparison of meat quality characteristics between young and spent quails. *Int Food Res J.* 2010; 17:661-666.

Botsoglou NA, Florou-Paneri P, Christaki E, Fletouris DJ, Spais AB. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. *Br Poult Sci.* 2002; 43:223-230.

Bulbul T, Yesilbag D, Ulutas E, Biricik H, Gezen SS, Bulbul T. Effect of myrtle (*Myrtus Communis L.*) oil on performance, egg quality, some biochemical values and hatchability in laying quails. *Revue Med Vet.* 2014; 165:280-288.

Chmiel M, Roszko M, Adamczak L, Florowski T, Pietrzak D. Influence of storage and packaging method on chicken breast meat chemical composition and fat oxidation. *Poult Sci.* 2019; 36:69-75.

Cortinas L, Barroeta A, Villaverde C, Galobart J, Guardiola F, Baucells MD. Influence of the dietary polyunsaturation level on chicken meat quality: Lipid Oxidation. *Poult Sci.* 2005; 84:48-55.

- Crespo N, Esteve-Garcia E.** Dietary fatty acid profile modifies abdominal fat deposition in broiler chickens. *Poult Sci.* 2001; 80:71-78.
- Domínguez R, Pateiro M, Gagaoua M, Barba FJ, Zhang W, Lorenzo JMA.** Comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants (Basel)*, 2019; 8:429.
- Draper HH, Hardley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421-30.
- El-Yamany AT, El-Allawy HMM, Abd El-Samee ELGhamry AA.** Evaluation of using different levels and sources of oil in growing Japanese quail diets. Evaluation of using different levels and sources of oil in growing Japanese quail diets. *Amer Euras J Agric Envir Sci.* 2008; 3:577-582.
- Erener G, Ocak N, Garipoglu AV.** The influence of dietary hazelnut kernel oil on the performance and fatty acid composition of broilers. *J Sci Food Agric.* 2007; 87:689-693.
- Jalali SMA, Rabiei R, Kheiri, F.** Effects of dietary soybean and sunflower oils with and without L-carnitine supplementation on growth performance and blood biochemical parameters of broiler chicks. *Arch Anim Breed.* 2015; 58:387-394.
- Kerr MG.** *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Biochemistry and Haematology.* 2nd Edition. Blackwell Science Ltd, 2008; London
- Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S.** Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *J Clin Pathol.* 2001; 54:356-361.
- Lee A, Thurnham DI, Chopra M.** Consumption of tomato products with olive oil but not sunflower oil increases the antioxidant activity of plasma. *Free Radic Bio Med.* 2000; 29:1051-1055.
- Leeson S, Summers J.** *Nutrition of the Chicken.* University Books. Guelph, Ontario, 2001; Canadá, P67.
- Lopez-Ferrer S, Baucells MD, Barroeta AC, Grashorn MA.** Influence of vegetable oil sources on quality parameters of broiler meat. *Archiv Geflug.* 1999; 63:29-35.
- Mahmoud H, Haggag A, El-Gebaly H.** Toxicological studies of malathion on Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Life Sci J.* 2012; 9:1725-1732.
- Maniila HA, Husvéth F, Németh K.** Effects of dietary fat origin on the performance of broiler chickens and on the fatty acid composition of selected tissues. *Acta Agraria Kaposvariensis,* 1999; 3:47-57.
- Midilli M, Bayram I, Erol H, Cetingul IS.** The effects of dietary poppy seed oil and sunflower oil on performance, reproduction and egg quality parameters and fatty acid profile of egg yolk in the Japanese quail. *J Anim Vet Adv.* 2009; 8:379-384.
- Mohamed AI, Hussein AS, Bhatena SJ, Hafes YS.** The effect of dietary menhaden, olive, and coconut oil fed with three levels of vitamin E on plasma and liver lipids and plasma fatty acid composition in rats. *J Nut Biochem.* 2002; 13:435-441.
- Newman RE, Bryden WL, Fleck E, Ashes JR, Buttemer WA, Storlien LH, Downing JA.** Dietary N-3 and N-6 fatty acids alter avian metabolism: metabolism and abdominal fat deposition. *Br J Nutr.* 2002; 88:11-18.
- NRC (National Research Council) Nutrient Requirements of Dairy Cattle.** 7th rev. ed. National Academy Press, 2001; Washington, DC.
- Pinchasov Y, Nir I.** Effect of dietary polyunsaturated fatty acid concentration on performance, fat deposition, and carcass fatty acid composition in broiler chickens. *Poult Sci.* 1992; 71:1504-1512.
- Sanz M.** Higher lipid accumulation in broilers fed on saturated fats than in those fed on unsaturated fats. *Br Poult Sci.* 1999; 40:95-101.
- Scaife JR, Moyo J, Galbraith H, Michie W, Campbell V.** Effect of different dietary supplemental fats and oils on the tissue fatty acid composition and growth of female broilers. *Br Poult Sci.* 1994; 35:107-118.
- Senanayake S, Ranasinghe J, Waduge R, Nizanantha K, Alexander A.** Changes in the serum enzyme levels and liver lesions of broiler birds reared under different management conditions. *Trop Agric Res.* 2015; 264:584-595.
- Yesilbag D, Gezen S, Biricik H, Bulbul T.** Effect of a rosemary and oregano volatile oil mixture on performance, lipid oxidation of meat and haematological parameters in Pharaoh quails. *Br Poult Sci.* 2012; 53:89-97

Determination of Heavy Metal Level in Grey Mullet (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758) Fish Caught from Bafa Lake

Süleyman ÖNER¹, Murat METLİ²

¹Muğla Sıtkı Koçman University, Milas Vocational School, Hotel Restaurant and Catering Services Department, 48200, Milas/Muğla, Turkey.

²Muğla Sıtkı Koçman University, Faculty of Milas Veterinary Medicine, Food Hygiene and Technology Department, 48200, Milas/Muğla, Turkey.

ABSTRACT

Seafood are an ideal animal products as adequate and balanced nutrition for human. However, fish affected by environmental pollution maybe transfer the harmful effects of pollution to humans at the end of the food chain. Bafa Lake has been frequently mentioned with the environmental pollution problems in recent years. In this study, the accumulation of copper (Cu), zinc (Zn), iron (Fe), cadmium (Cd), and lead (Pb) heavy metal elements were investigated in the fillet, gonad, liver, and gills of grey mullet fish, which is one of the most caught fish species from Bafa Lake. According to the results obtained, more element concentration levels were determined in the liver and gills than ones in the muscle tissue. Cu concentration was ranked according to tissues, liver > gill > gonad > fillet form; Zn amount, liver > gonad > gill > fillet form; Fe amount, liver > gill > gonad > fillet shaped; Cd amount, liver > filet > gill > gonad. The amount of Pb was found in the form of gonat > liver > filet > gill. It was determined that 16% Cd and 68% Pb out of all the muscle tissue in the samples had above the consumable limit respectively. So, these results are a very risky situation for public health. In order to prevent environmental pollution in Bafa Lake and its harmful effects on humans and other living things, it should not be disconnected from the Meander (Büyük Menderes) River, industrial discharges to be made in the Meander River should be done after treatment, and basin management should always be at the forefront in the development works around the lake.

Keywords: Heavy Metal, Bafa Lake, Grey Mullet (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758), AAS.

Bafa Gölü'nden Avlanan Topan Kefal (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758) Türü Balıklarda Ağır Metal Düzeyinin Belirlenmesi

ÖZ

Su ürünleri yeterli ve dengeli beslenme için ideal hayvansal ürünlerdir. Ancak çevre kirliliğinden etkilenen balıklar, beslenme zincirinin sonundaki insana, kirliliğin zararlı etkilerini aktarabilmektedir. Bafa Gölü, son yıllarda görülen çevre kirliliği problemleriyle adından sıkça söz ettirmektedir. Bu çalışmada, Bafa Gölü'nden en çok avlanan balık türlerinden olan topan kefalın fileto, gonat, karaciğer ve solungaçlarında, bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe), kadmiyum (Cd) ve kurşun (Pb) elementlerinin birikimleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, karaciğer ve solungaçlarda kas dokuya göre daha fazla miktarda element konsantrasyonu belirlenmiştir. Cu konsantrasyonu sıralaması dokulara göre, karaciğer > solungaç > gonat > fileto şeklinde; Zn miktarı, karaciğer > gonat > solungaç > fileto şeklinde; Fe yoğunluğu, karaciğer > solungaç > gonat > fileto şeklinde; Cd miktarı, karaciğer > fileto > solungaç > gonat şeklinde; Pb miktarı ise gonat > karaciğer > fileto > solungaç şeklinde bulunmuştur. Kas doku örneklerinin %16'sında Cd, % 68'inde Pb miktarlarının tüketilebilirlik sınırının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç insan sağlığı açısından oldukça riskli bir durumdur. Bafa Gölü'nde çevre kirliliğinin ve bunun insanlara ve diğer canlılara olan zararlı etkilerinin önüne geçebilmek için, gölün Büyük Menderes Nehri ile olan bağlantısı kesilmemeli, Büyük Menderes Nehri'ne yapılacak endüstriyel deşarjlar, arıtım sonrası yapılmalı, göl çevresindeki imar çalışmalarında havza yönetimi hep ön planda olmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Ağır Metal, Bafa Gölü, Topan Kefal (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758), AAS.

To cite this article: Öner S, Metli M. Determination of Heavy Metal Level in Grey Mullet (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758) Fish Caught from Bafa Lake. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):65-70

Submission: 07.01.2021

Accepted: 18.02.2021

Published Online: 19.02.2021

ORCID ID; S.Ö.: 0000-0002-0593-9610, M.M.: 0000-0001-9247-3347

*Corresponding author e-mail: muratmetli@mu.edu.tr

GİRİŞ

Su ürünleri yeterli ve dengeli beslenme için ideal hayvansal ürünlerdir. Esansiyel aminoasitlere sahip proteinleri, birden fazla çift bağ içeren çoklu doymamış yağ asitlerine sahip lipidleri, çok düşük karbonhidrat miktarı, dengeli bir şekilde içerdiği vitamin ve mineral içeriği ile su ürünleri özellikle de balıklar değerli besinlerdir (Varlık, 2004).

Ancak su ürünlerinin yaşamını sürdürdüğü su ortamları, endüstriyel, zirai ve evsel kaynaklı çevre kirleticilerinin en sonunda biriktiği alıcı ortamlar olmaktadır (Nassouhi ve ark. 2018). Su canlılarından hareketli olanlar, çevre kirleticilerinin olumsuz etkilerinden temiz alanlara kaçarak nispeten daha az etkilenenler de biyolojik özellikleri nedeniyle sabit yaşam sürdüren su canlıları (midye, istiridye v.b.) en çok etkilenenlerdir. Göl, lagün gibi su sirkülasyonunun çok az veya hiç olmadığı kapalı havzalarda ise durum daha da kötü olabilmektedir. Çevresel kirleticiler gölün tamamına sirayet edip, hareketli su canlılarını dahi kontamine ederek zararlı maddelerin organizmalarda birikimine neden olabilmektedir (Łuczynska ve ark., 2018).

Su alıcı ortamlarını kirlüten ve canlı ekosisteminde dengeyi bozan kirleticiler, inorganik ve organik yapıda olabilmektedir. Bu kirleticiler metaller, pestisitler, poliklorlu bifeniller (PCB), polibromlu difenil eterler (PBDE), dioksinler, furanlar ve poliaromatik hidrokarbonlar (PAH)'dır. Bu kirleticiler, suda yaşayan organizmalara toksik etki yaptığı gibi su canlılarıyla beslenen, beslenme zincirinin tüm aşamalarındaki canlıları ve insanları da etkilemektedir (Webb ve Gagnon, 2002, Hernández ve ark. 2017).

5 g/cm³ 'ten daha yüksek yoğunlukta ve düşük konsantrasyonlarda bile toksik etkiler gösteren metaller ve metaloidlere ağır metal adı verilmektedir. Bunlardan Bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe) gibi ağır metaller, canlı vücudunda önemli işlevlerin yerine getirilmesinde görev alırlar ve esansiyel metaller olarak sınıflandırılırlar. Non-esansiyel metaller olarak bilinen kadmiyum (Cd), kurşun (Pb), civa (Hg) gibi ağır metaller ise canlı organizması için bilinen bir fonksiyona sahip olmamasına rağmen, çok düşük dozlarda dahi toksik etkiler gösterebilmektedirler. Bu arada esansiyel metallerin de belirli yoğunluğun üzerinde alındıklarında toksik etki gösterebileceği, gözden kaçırılmaması gereken bir konudur (Järup, 2003, Nassouhi ve ark. 2018).

Topan kefal, tropik ve subtropik sığ sularda yaşayan, zaman zaman haliç ve lagünlere de girip çıkan, ekonomik bir balık türüdür. Hem yetişkin hem de genç balıklar, zooplankton larvaları, organik atıklar ve mikro alglerle beslenirler. Ekolojik açıdan önemli olmaları ve gıda zincirinde anahtar rol oynamaları

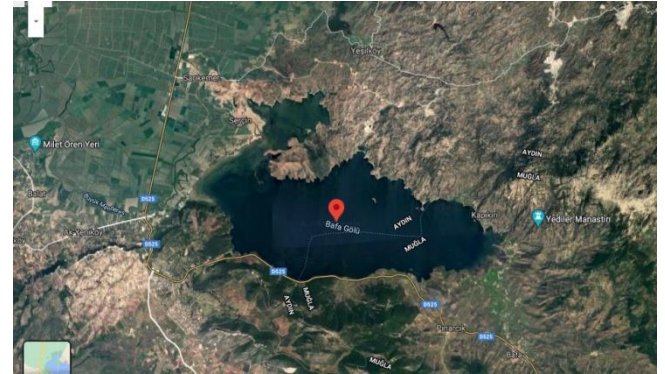
nedeniyle toksisite çalışmaları için test organizması olarak kullanılmaktadırlar (Nagarjuna, Mohan, 2017). Bafa Gölü'nde ekonomik olarak en çok avlanan balık çeşitleri kefal türleridir (Mugil spp.). Kefal türleri içinde de topan kefal öne çıkmaktadır (Şaşı ve Yabanlı, 2015).

Bu araştırma, Bafa Gölü'nde avlanan topan kefal balıklarında seçilmiş ağır metal (Cu, Zn, Fe, Cd, Pb) kontaminasyon düzeyinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışma Alanı

Bafa Gölü, Ege Bölgesi Kıyı Ege Bölümü'nde antik Milet Şehrinin doğusunda yer alan Türkiye'nin en büyük kıyı göllerinden biridir (Müllenhoff ve ark., 2004), (Resim 1). Büyük Menderes Nehir Havzasının güneydoğu kesiminde, Teke Dağlarının kuzeyinde, Batı Menteşe Dağlarının batısında bulunan sığ bir tatlı su gölüdür. Göl, 37° 31' Kuzey, 27° 27' Doğu koordinatlarında yer alır (Şaşı ve Yabanlı, 2015). Antik çağlarda Ege Denizi ile birleşik bir körfez olan (Latmos Körfezi) Bafa Gölü'nün kuzey batı yönünün, Büyük Menderes Nehri'nin taşıdığı alüvyonlarla set şeklinde kapatılmasıyla günümüzde göl halini almıştır (Müllenhoff ve ark., 2004).



Resim 1: Bafa Gölü Haritası (Yandex Harita)

Figur 1: Bafa Lake Map (Yandex Map)

Örneklerin Toplanması ve Analize Hazırlanması:

Bafa Gölü'nden Ekim 2015 ile Mart 2016 arasında avlanan topan kefal numuneleri, haftada bir steril şartlarda alınıp soğuk zincir içerisinde Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Merkezine getirilmiştir. Analiz öncesinde balıkların fileto (kas), gonat (eşey organı), karaciğer ve solungaçları diseke edilerek tüm dokuların ayrı ayrı homojenizasyonları yapılmıştır. 24 hafta boyunca örnek alım işlerine devam edilerek 25 örnek toplanmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Örneklerin Analizi:

Doku örnekleri, sabit tartıma gelmesi için 120 °C'de kurutulmuştur. Kuru örneklerden 0,5 g alınmış ve üzerine 8 mL HNO₃ ve 2 mL H₂O₂ ilave edilerek mikrodalga fırında (Cem Mars 5) 200 °C'de 300 psi basınçta yaş yakma yapılmıştır. Cu, Fe ve Zn elementlerinin analizi alevli atomik absorpsiyon spektrometrede (AAS) (Agilent240FS AA), Cd ve Pb elementlerinin analizi ise grafit fırın AAS'de (Agilent GTA 120) yapılmıştır.

Bu çalışmada, toplanan 25 adet topan kefal örneğinden diseksiyonla fileto, gonat, karaciğer ve solungaç dokuları elde edilmiştir. Her bir dokudan 25 adet olmak üzere toplamda 100 dokuda Cu, Zn, Fe, Cd, Pb elementlerinin düzeylerine bakılmıştır. Topan kefal balık örneklerinin çeşitli organ ve kısımlarında belirlenen ağır metal düzeyleri (mg/kg) Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: Topan kefal balık örneklerinin çeşitli organ ve kısımlarında belirlenen ağır metal düzeyleri (mg/kg)
Table 1: Heavy metal levels determined in various organs and parts of topan grey mullet fish samples (mg/kg)

		Bakır (Cu)	Çinko (Zn)	Demir (Fe)	Kadmiyum (Cd)	Kurşun (Pb)
Fileto	X±Sx	1,87±2,25	4,11±2,08	4,10±3,28	0,036±0,104	0,34±0,15
	Min	0,000	2,37	0,00	0,000	0,03
	Max	8,73	9,75	9,83	0,501	0,60
Gonat	X±Sx	1,96±2,28	13,82±8,23	12,26±13,21	0,016±0,044	0,51±0,44
	Min	0,00	0,20	0,00	0,000	0,14
	Max	10,41	28,09	48,79	0,225	2,47
Karaciğer	X±Sx	42,33±38,65	27,10±23,91	137,24±78,19	0,128±0,099	0,39±0,13
	Min	1,71	9,88	22,24	0,000	0,15
	Max	165,33	115,54	311,78	0,377	0,56
Solungaç	X±Sx	7,85±16,38	12,72±5,15	58,51±21,87	0,028±0,075	0,34±0,13
	Min	0,00	1,33	8,04	0,000	0,08
	Max	58,94	28,05	114,19	0,322	0,50

Elde edilen element konsantrasyonlarının dokulara göre dağılımı incelendiğinde karaciğer ve solungaçlarda kas dokuya göre daha fazla miktarda element belirlenmiştir. Cu konsantrasyonu sıralaması dokulara göre, karaciğer > solungaç > gonat > fileto şeklinde; Zn miktarı, karaciğer > gonat > solungaç > fileto şeklinde; Fe yoğunluğu, karaciğer > solungaç > gonat > fileto şeklinde; Cd miktarı, karaciğer > fileto > solungaç > gonat şeklinde; Pb miktarı ise gonat > karaciğer > fileto > solungaç şeklinde bulunmuştur.

Türkiye ve Avrupa Birliği mevzuatında, bu çalışmada incelenen ağır metallere sadece Cd ile Pb için balıklarda tüketilebilirlik sınırı belirlendiğinden söz konusu elementlerde bu mevzuata göre değerlendirme yapılmıştır (Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği, 1881/2006/EC). Cu, Zn ve Fe için ise Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) bildirdiği tüketilebilirlik sınırı dikkate alınmıştır (FAO/WHO, 1989; Aşgedom ve ark., 2012). Mevzuatta limitler yaş ağırlık üzerinden verildiği için karşılaştırma yapılabilmesi için çalışmamızda kuru madde oranı üzerinden elde edilen sonuçlar, rutubet oranı kullanılarak düzeltilmiştir.

Buna göre yenilebilir kısım olan filetolarda, Cu, Zn ve Fe miktarı tespit edilemeyen örnekler olduğu gibi tüketilebilir limitin üzerinde miktara rastlanmamıştır. Gonatlarda da Cu, Zn ve Fe miktarı tespit edilemeyen örnekler olduğu gibi tüketilebilir limitin üzerinde miktara rastlanmamıştır. Fileto örneklerinin %16'sında Cd, % 68'inde Pb miktarlarının tüketilebilirlik sınırının üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Gonatların % 4'ünde Cd, % 80'inde Pb miktarlarının tüketilebilirlik sınırının üzerinde olduğu

tespit edilmiştir. Karaciğer örneklerinin % 56'sında Cu ve Fe, % 12'sinde Zn, % 76'sında Cd, % 72'sinde Pb miktarlarının tüketilebilirlik sınırının üzerinde olduğu görülmüştür. Solungaçların da % 16'sında Cu, % 4'ünde Fe, % 12'sinde Cd, % 64'ünde Pb miktarlarının tüketilebilirlik sınırının üzerinde olduğu belirlenmiştir. Solungaçların hiçbiri Zn açısından tüketilebilirlik sınırını aşmamıştır.

Bafa Gölü ve Büyük Menderes Nehri'nin bağlantısı iki kanal vasıtası ile sürdürülmektedir. Böylece gölün taze su girişi çıkışı sağlanmaktadır. Ancak tarımsal sulama faaliyeti için Büyük Menderes Nehri'nin suyuna ihtiyaç duyulduğu sezonlarda (yılda yaklaşık 5-6 ay) bu bağlantı kesilmekte ve Bafa Gölü'nün su sirkülasyonu engellenmektedir. Ayrıca Büyük Menderes Nehri'nin beslediği Afyon, Uşak, Aydın ve Denizli havzalarından kaynaklanan evsel, endüstriyel ve tarımsal faaliyet atıkları nehir vasıtasıyla Bafa Gölü'ne taşınmaktadır. Göle ulaşan atıklar kanal tabanına göre daha derin olan Bafa Gölü'nde birikmektedir (Anonim, 2018; Kesici ve Kesici, 2014). Gölün yakın havzasında yapılan tarımsal faaliyetler, zeytinyağı üretim tesisleri, turistik tesis kaynaklı atıklar ile evsel atıklar da gölün kirliliğini arttıran unsurlardır (Kesici ve Kesici, 2014).

Çevre kirliliği doğrudan temas halindeki canlıları etkilediği gibi beslenme zinciri vasıtasıyla kirlilik odağından uzak yaşayan insanları da olumsuz etkileyebilmektedir. Çevre kirliliğini oluşturan başat unsurlardan ağır metaller arasında insan sağlığını olumsuz etkileyen Pb ve Cd önemli elementler olmakla birlikte; Fe, Cu ve Zn elementleri de canlılar için esansiyel fakat belirli düzeyin üzerinde alındığında yine insan sağlığını olumsuz etkileyebilmektedir (Yipel ve Yarsan 2014).

Ağır metal birikimi, kas dokularında, diğer doku ve organlara göre (karaciğer, gonat ve solungaç gibi) daha az olmasına rağmen kas dokunun gıda olarak tüketilen kısım olması nedeniyle buradaki birikim daha önemlidir. Balıklarda solungaçlar, çözünmüş metallerin organizmaya girdiği yer ve karaciğer de detoksifikasyonunun gerçekleştirildiği organ olduğu için ağır metal yoğunluğuna bu iki organda daha çok rastlanabilmektedir (Yipel, 2012).

Yılmaz (2009) Köyceğiz Gölü'nden yakalanan 44 adet topan kefal örneğinde Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerini indüktif eşleşmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi (ICP/AES) ile araştırmış ve örneklerin kas dokularında Cu, Zn, Cd ve Pb miktarlarının ortalama olarak sırasıyla 6,34; 98,6; 0,12; 0,43 mg/kg; karaciğer dokularında 749,76; 402,61; 3,32; 0,78 mg/kg; solungaçlarında da 5,68; 176,93; 0,37; 1,96 mg/kg düzeyinde olduğunu bildirmiştir. Bizim

çalışmamızda ise tüm ağır metallerin daha düşük tespit edildiği gözlenmektedir.

Yabanlı ve ark. (2013) Bafa Gölü'nden elde edilen 22 adet levreğin kas, karaciğer ve solungaçlarında Cu, Cd, ve Pb elementlerinin miktarını indüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICP-MS) ile analiz etmiş ve kas dokularında Cu, Cd, ve Pb yoğunluğunu ortalama olarak sırasıyla 0,61; 0,05; 0,23 mg/kg; karaciğer dokularında 1,09; 0,02; 0,25 mg/kg; solungaçlarda 0,48; 0,04; 0,34 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Kas dokudaki ağır metal oranı bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Ancak karaciğerde özellikle Cu yoğunluğunun bizim çalışmamıza göre daha fazla olduğu görülmektedir.

Aydın-Önen ve ark. (2015) Bafa Gölü'nden Eylül 2010 ile Mayıs 2011 arasında toplanan topan kefal balıklarında ağır metal miktarlarını AAS ile analiz etmişler, kas dokularında Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerini sırasıyla ortalama 1,18; 16,01; 0,02; 0,73 mg/kg; karaciğerlerinde de 190,62; 160,31; 0,59; 0,57 mg/kg bulmuşlardır. Aydın-Önen ve arkadaşlarının çalışmasında ağır metal oranının bir miktar fazla olduğu gözlenmektedir.

Bayhan ve Ünübol Aypak (2016) Büyük Menderes Nehri'nin Deltasında avlanan kefal örneklerini indüktif eşleşmiş plazma-optik emisyon spektrometresi (ICP-OES) ile analiz etmişler ve kas dokularında Cu, Zn ve Cd konsantrasyonunu sırasıyla ortalama 25,21; 101,83; 6,07 mg/kg; karaciğerlerinde 378,56; 527,60; 9,13 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Ağır metal miktarının hem kas dokuda hem de karaciğerde bizim çalışmamızdan oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Damodharan ve Reddy (2013) kurak ve yağışlı mevsimlerde olmak üzere Hindistan Uppanar Nehri'nin aşağı ve yukarı kesimlerinden elde edilen 56 adet topan kefalın kas dokularında Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerinin yoğunluğuna AAS ile analiz etmişlerdir. Kurak mevsimde Uppanar Nehri'nin yukarı kesiminden elde edilen balıklarda Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerini sırasıyla ortalama 0,04; 14,09; 0,01; 0,055 mg/kg, aşağı kesiminden elde edilen balıklarda aynı elementleri 0,18; 16,26; 0,01; 0,19 mg/kg tespit etmişlerdir. Yağışlı sezonda yukarı kesimden avlanan örneklerde yine Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerini sırasıyla ortalama 0,02; 3,11; 0,002; 0,02 mg/kg; aşağı kesimden elde edilen balıklarda 0,13; 8,32; 0,01; 0,10 mg/kg olarak tespit etmişlerdir. Bu çalışmada Zn miktarının bizim çalışmamıza göre yüksek diğer ağır metallerin ise düşük olduğu gözlenmektedir.

Krishna ve ark. (2014) Hindistan, Machilipatnam Sahili'nden toplanan topan kefal örneklerinde Cu, Zn,

Cd elementlerinin miktarını AAS ile araştırmışlardır. Balıkların kas dokularında Cu, Zn, Cd elementlerinin yoğunluğunu sırasıyla ortalama 25,21; 101,83; 6,07 mg/kg; karaciğerlerde 378,56; 527,60 ve 9,13 mg/kg tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamıza göre Krishna ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlar oldukça yüksek görülmektedir.

Makedonski ve ark. (2017) Bulgaristan'ın Kara Deniz kıyılarından elde ettikleri 6 adet topan kefalde Cu, Zn, Cd ve Pb elementlerini AAS ile analiz etmişler ve kas dokuda Cu, Zn, Cd ve Pb miktarını sırasıyla ortalama 0,34; 5,2; 0,012; 0,05 mg/kg; solungaçlarda ise 0,96; 7,3; 0,013; 0,07 mg/kg bulmuşlardır. Bizim araştırmamıza göre bu araştırmada bulunan ağır metal içeriklerinin düşük olduğu görülmektedir.

Bizim çalışmamız ile diğer araştırma sonuçları arasındaki farklılıkların sebebinin, alıcı ortamların kirlilik düzeylerinin değişken olması, balık türleri arasındaki metabolizma farklılığı, ağır metal miktarı hesabının kuru ağırlık üzerinden yapılması, çalışmanın su debisinin azaldığı ve ağır metal konsantrasyonunun yükseldiği yaz aylarında yapılmış olması gibi sebeplerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

SONUÇ

Bafa Gölü'nde yaptığımız bu çalışmada özellikle iz elementlerden olan Cd ve Pb'nin balığın yenilebilir kısımlarında, mevzuatta belirtilen tüketilebilir limitlerin üstünde olduğu görülmektedir. Bu sonuç insan sağlığı açısından oldukça riskli bir durumdur. Bilinçli veya bilinçsiz olarak doğaya bırakılan atıklar, genel olarak beslenme zincirinin son halkası olan insana sağlık riski olarak geri yansımaktadır. Beslenme yoluyla organizmaya alınan ağır metallerin sağlığa olan etkilerinin uzun vadede ortaya çıkması, bu sorunun göz ardı edilmesine sebep olmaktadır. Bafa Gölü'nde kirliliğin önlenmesi için Büyük Menderes ile olan bağlantısının kesilmemesi gerekmektedir. Ayrıca çok geniş bir havzanın alıcı ortamı olan Büyük Menderes Nehri'ne yapılacak endüstriyel deşarjlar, arıtım sonrası yapılmalıdır. Bafa Gölü'nün ve Büyük Menderes Nehri'nin kirlilik parametreleri bir plan dahilinde izlenmelidir. Tarımsal ilaç kutularının, ilaçlama alet ve ekipmanların temizliği; atıklarının alıcı ortamlara (akarsu, göl) ulaşacağı şekilde yapılmamalıdır. Bunun için çok geniş bilgilendirme kampanyaları düzenlenmelidir. Göl çevresindeki imar çalışmalarında havza yönetimi hep ön planda olmalıdır. Artık, çevre kirliliği göz zevkini bozan bir durum olmaktan çıkmış, insan sağlığına kasteden bir vaka haline gelmiştir.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK iznine tabi değildir.

Finansal destek: Bu çalışma Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "15/069" proje numarası ile desteklenmiştir.

Açıklama: Bu çalışmada desteklerini veren Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Gıda Analizleri Uygulama ve Araştırma Merkezi araştırmacılarına Teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- Anonim,** Aydın Büyükşehir Belediyesi. Aydın-2040, 1/25.000 ölçekli nazım imar planı açıklama raporu. 2018. Erişim Adresi: <https://aydin.bel.tr/Content/assets/Videolar/2312019143104.pdf>
- Asgedom AG, Desta MB, Gebremedhin YW.** Bioaccumulation of heavy metals in fishes of Hashenge Lake, Tigray, Northern Highlands of Ethiopia, American Journal of Chemistry, 2012; 2(6): 326-334.
- Aydın-Önen S, Küçüksezgin F, Koçak F, Açık S.** Assessment of heavy metal contamination in *Hediste diversicolor* (O.F. Müller, 1776), *Mugil cephalus* (Linnaeus, 1758), and surface sediments of Bafa Lake (Eastern Aegean), Environ Sci Pollut Res., 2015; 22:8702–8718.
- Bayhan T, Ünübol Aypak S.** Büyük Menderes Deltasından avlanan kefal ve levreklerde Cu, Zn ve Cd düzeylerinin belirlenmesi ve metalotiyonin ile ilişkisinin araştırılması, GIDA, 2016; 41 (5): 359-365
- Commission Regulation** 2006/1881/ EC European Commission (2006) setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Brussels.
- Damodharan U, Reddy M.V.** Heavy metal bioaccumulation in edible fish species from an industrially polluted river and human health risk assessment, Arch. Pol. Fish., 2013; 21: 19-27.
- Hernández ÁR, Camacho M, Henríquez-Hernández LA, Boada LD, Valerón PF, Zaccaroni A, Zumbado M, Almeida-González M, Rial-Berriel C, Luzardo OP.** Comparative study of the intake of toxic persistent and semi persistent pollutants through the consumption of fish and seafood from two modes of production (wild-caught and farmed). Science of the Total Environment, 2017;575: 919–931.
- Järup L.** Hazards of heavy metal contamination, British Medical Bulletin, 2003; 68: 167–182
- Kesici E ve Kesici C.** Bafa Gölü Tabiat Parkında yaşam son bulurken son çığlık eylemi, Tabiat ve İnsan, 2014; 48(188): 25-31

- Krishna PV, Madhusudhana Rao K, Swaruparani V.** Heavy metals concentration in fish *Mugil cephalus* from Machilipatnam Coast and Possible Health Risks to Fish Consumers, *British Biotechnology Journal*, 2014; 4(2): 126-135
- Łuczynska J, Paszczyka B, MJ. Łuczynski MJ.** Fish as a bioindicator of heavy metals pollution in aquatic ecosystem of Pluszne Lake, Poland, and risk assessment for consumer's health, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018; 153:60–67.
- Makedonski L, Peycheva K, Stancheva M.** Determination of heavy metals in selected black sea fish species, *Food Control*, 2017; 72: 313-318.
- Müllenhoff M, Handl M, Knipping M, Brückner H.** The evolution of Lake Bafa (Western Turkey)–Sedimentological, microfauna and palynological results, 2004; *Coastline Rep* 1:55–66.
- Nagarjuna A, Mohan D.** Biochemical and histopathological changes induced by nickel in the striped mullet, *Mugil cephalus* (Linnaeus 1758), *Bull Environ Contam Toxicol*. 2017; 98: 33-40.
- Nassouhi D, Ergönül MB, Fikirdeşici Ş, Karacakaya P, Atasagun S.** Ağır metal kirliliğinin biyoremediasyonunda bazı su içi ve yüzücü sucül makrofitlerin kullanımı, *Süleyman Demirel Üniversitesi Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, 2018; 14(2), 148-165.
- Şaşı H, Yabanlı M.** Bafa Gölü'nün biyo-çeşitliliği ve çevresel sorunları, Tuna M, (Proje Yürütücüsü) Bafa Gölü Havzasında toplum destekli ekoturizm faaliyetlerinin belirlenmesi projesi sonuç raporu, Proje No: GEKA TR32 14 DFD 0043, 2015; Erişim adresi: https://geka.gov.tr/uploads/pages_v/bafa-golu-havzasinda-toplum-destekli-ekoturizm-faaliyetlerinin-belirlenmesi-2014.pdf
- Türk Gıda Kodeksi Bulaşanlar Yönetmeliği** (2011, 29 Aralık). Resmi Gazete (Sayı: 28157 (3. Mükerrer)). Erişim adresi: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-8.htm>
- Varlık C, Erkan N, Baygar T.** Su ürünleri besin bileşimi, In *Su ürünleri işleme teknolojisi*, Ed; Varlık C. İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No:4465, İstanbul, 2004; p.p. 1-43.
- Webb D, Gagnon M.M.** Biomarkers of Exposure in fish inhabiting the swan-canning Estuary, Western Australia- A Preliminary Study, *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 2002; 9:259-269.
- WHO/FAO.** National Research Council Recommended Dietary 626 Allowances (10th ed). National Academy Press. Washington, DC. USA. 1989.
- Yabanlı M, Coşkun Y, Öz B, Yozukmaz A, Sel F, Öndeş S.** Bafa Gölü'nden elde edilen levreklerde (*Dicentrarchus Labrax*) ve göl suyunda ağır metal içeriğinin belirlenmesi ve balık/halk sağlığı açısından durum değerlendirmesi, *Bornova Vet. Bil. Derg.*, 2013; 35 (49): 15-23.
- Yandex Harita.** (2020) Bafa Gölü Haritası [Harita]. Erişim Adresi: https://yandex.com.tr/harita/983/turkey/geo/bafa_golu/2525113833/?l=sat%2Cskl&ll=27.453045%2C37.515059&z=12
- Yılmaz F.** The comparison of heavy metal concentrations (Cd, Cu, Mn, Pb, and Zn) in tissues of three economically important fish (*Anguilla anguilla*, *Mugil cephalus* and *Oreochromis niloticus*) inhabiting Köyceğiz Lake-Mugla (Turkey), *Turkish Journal of Science & Technology*, 2009; Volume 4, No 1: 7-15.
- Yipel M, Yarsan E.** A Risk Assessment of heavy metal concentrations in fish and an invertebrate from the Gulf of Antalya, *Bull Environ Contam Toxicol.*, 2014; 93:542–548
- Yipel M.** Akdeniz Antalya Körfezi'nde avlanan barbunya (*Mullus barbatus*, Linnaeus, 1758), kefal (*Mugil cephalus*, Linnaeus, 1758), yeşil kaplan karidesi (*Panaeus semisulcatus*, De Haan, 1844) türlerinde bazı ağır metal düzeylerinin belirlenmesi (Doktora Tezi) 2012. Erişim Adresi: <https://dspace.ankara.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12575/35394>

First Molecular Characterization of *Hysterothylacium Fabri* Larvae (Nematoda: Raphidascarididae) in the Mediterranean Sea Based on the Small Subunit Ribosomal RNA Gene Sequence

Emrah ŞİMŞEK¹, Neslihan SÜRSAL², Gupse Kübra KARADEMİR³, Gökmen Zafer PEKMEZCİ^{4*}

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

²Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, Aksaray, Turkey

³Erciyes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Parasitology, TR-38039, Kayseri, Turkey

⁴Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Aquatic Animal Diseases, TR-55200, Samsun, Turkey

ABSTRACT

Hysterothylacium fabri is commonly reported in various Mediterranean fish. However, there is no data on the mitochondrial ribosomal RNA (*rrnS*) gene sequence of *H. fabri* larvae in the Mediterranean Sea waters. Therefore, we aimed to reveal molecular characterization of *H. fabri* based on the *rrnS* gene sequence in the current study. Firstly, the fourth stage of *H. fabri* larvae were identified at parasitological examination from *Mullus barbatus* in the Mediterranean Sea. Morphologically identified *H. fabri* larvae herein were also supported by the sequencing of the nuclear ribosomal ITS gene regions. In the next step, the *rrnS* gene of these larvae was molecularly analysed. Our *H. fabri* isolate (MK886659) showed 96.42% identity with *H. fabri* reported from China (MF140349) based on the *rrnS* gene. The nucleotide difference based on the *rrnS* gene between Chinese isolate (MF140349) and our *H. fabri* isolate (MK886659) was determined as 3.2%. Consequently, for the first time, the mitochondrial *rrnS* gene sequencing of *H. fabri* from the Mediterranean waters were performed in the current study.

Keywords: *Hysterothylacium fabri*, Mediterranean Sea, Mitochondrial *rrnS* gene, Molecular characterization

Akdeniz'deki *Hysterothylacium Fabri* (Nematoda: Raphidascarididae) Larvasının İlk Kez Küçük Alt Ünite Ribozomal RNA Gen Bölgesinin Sekansına Göre Moleküler Karakterizasyonu

ÖZ

Hysterothylacium fabri sıklıkla farklı türdeki Akdeniz balıklarında bildirilmektedir. Ancak, Akdeniz sularındaki *H. fabri* larvasının mitokondriyal ribozomal RNA (*rrnS*) gen bölgesinin sekansı üzerine herhangi bir veri bulunmamaktadır. Bu yüzden, bu çalışmada, *H. fabri*'nin *rrnS* gen bölgesinin sekansına göre moleküler karakterizasyonunu ortaya koymayı amaçladık. İlk olarak, Akdeniz'deki *Mullus barbatus*'tan dördüncü dönem *H. fabri* larvaları parazitolojik muayenede teşhis edildi. Burada morfolojik olarak teşhis edilen *H. fabri*, nükleer ribozomal ITS gen bölgesinin DNA dizi analizi ile de desteklendi. Bir sonraki aşamada ise bu larvaların *rrnS* geni moleküler olarak analiz edildi. *RrnS* gen bölgesine göre, *H. fabri* izolatımız (MK886659) Çin'den rapor edilen *H. fabri* (MF140349) ile %96,42 oranında benzerlik gösterdi. Çin (MF140349) izolatı ile *H. fabri* (MK886659) izolatımız arasındaki nükleotid farklılığı ise *rrnS* genine göre %3,2 olarak belirlendi. Sonuç olarak bu araştırma ile ilk kez Akdeniz sularından *H. fabri*'nin mitokondriyal *rrnS* sekanslaması gerçekleştirildi.

Anahtar sözcükler: Akdeniz, *Hysterothylacium fabri*, Mitokondriyal *rrnS* gen, Moleküler karakterizasyon

To cite this article: Şimşek E, Sürsal N, Karademir G.K, Pekmezci G.Z. First Molecular Characterization of the Small Subunit Ribosomal RNA Gene of *Hysterothylacium Fabri* Larvae (Nematoda: Raphidascarididae) from Mediterranean Sea. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):71-76

Submission: 26.11.2020 Accepted: 10.02.2021 Published Online: 20.02.2021

ORCID ID; E.Ş: 0000-0002-0492-9840, N.S: 0000-0002-4144-9520, G.K.K: 0000-0002-3594-1770, G.Z.P: 0000-0002-7791-1959

*Corresponding author e-mail: zpekmezci@omu.edu.tr

INTRODUCTION

Hysterothylacium species are marine ascaridoids and over 70 recognizable species have been described in the worldwide (Moravec and Justine 2015). *Hysterothylacium* species were reported as larvae and adults in various marine teleost from the Mediterranean Sea (Barcala et al. 2018; Costa et al. 2018; Gazzonis et al. 2017; Keskin et al. 2015; Pekmezci et al. 2014; Petter and Maillard 1988; Roca-Gerones et al. 2018; Simsek et al. 2018; Szostakowska et al. 2001; Tedesco et al. 2018). Until now, five *Hysterothylacium* larval morphotypes (III, IV, V, VIII, IX) and *H. reliquens*, *H. fabri*, *H. aduncum*, and *H. girgenti* have been genetically identified using ribosomal and mitochondrial DNA markers in the Mediterranean waters (Barcala et al. 2018; Costa et al. 2018; Keskin et al. 2015; Pekmezci et al. 2014; Roca-Gerones et al. 2018; Simsek et al. 2018; Tedesco et al. 2018; Khammassi et al. 2020). There has been limited knowledge on the *H. reliquens*, *H. fabri*, and *H. aduncum* in marine teleost from Turkish Mediterranean waters (Keskin et al. 2015; Pekmezci et al. 2014; Simsek et al. 2018). Although there are molecular studies for the certain identification of marine ascaridoid species, the taxonomy of the genus *Hysterothylacium* in Mediterranean waters remains incomplete and unresolved (Costa et al. 2018). Moreover, there is no study on the *rns* gene sequence of molecular characterisation of *H. fabri* larvae in Mediterranean waters. Therefore, for the first time, we performed the molecular characterization of *rns* mitochondrial gene of *H. fabri* from the Mediterranean waters.

MATERIALS AND METHODS

Fish Sampling, Parasite Collection, and Morphological Examination

For this study, ethics committee approval was not needed because no handling of live marine teleost specimens was involved. A total of forty-five fresh and dead *Mullus barbatus* (L.) caught from the Turkish Mediterranean coast were purchased from local fishermen between March 2018 to May 2018 and examined under a stereomicroscope for the presence of *Hysterothylacium* spp. larvae in the digestive tract and visceral cavity. All nematodes were mechanically removed, washed in saline, and stored in ethanol solution. A middle portion of nematodes was used for genetic identification and other portions were individually cleared with lactophenol for using morphological identification. The nematodes were identified using the location of the excretory pore, the digestive systems, and the posterior ends (Petter and Maillard 1988; Tedesco et al. 2018). A subsample of five specimens of the fourth stage of *H. fabri* larvae was randomly selected and subjected to molecular analysis using a small middle portion of the nematodes.

DNA Extractions, PCR Amplifications, DNA Sequencing, and Phylogenetic Analysis

Genomic DNA was extracted from individual nematodes using the DNA extraction kit (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) following to the manufacturer's instructions. The PCR amplification targeting the nuclear ribosomal ITS gene and the mitochondrial ribosomal RNA (*rns*) gene were performed with the primers NC5/NC2 and MH3/MH4.5 primer pairs, respectively (D'Amelio et al. 2007; Zhu et al. 1998). For ITS gene, PCR mixture was prepared according to previously described by Pekmezci et al. (2014). PCR was carried out in a final volume of 50 µl, containing 10–50 ng of extracted DNA, 1× Taq Buffer with KCl (Thermo Scientific), 3 mM of MgCl₂ (Thermo Scientific), 0.3 mM dNTPs (Thermo Scientific), 2 pmol of each primer, 2.5 U of Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific), and DEPC-treated water. The PCR conditions were as follows: 15 min at 95 °C, then 30 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C followed by a final elongation of 5 min at 72 °C. For *rns* gene, PCR mixture was prepared according to previously described by D'Amelio et al. (2007) and PCR reaction (50 µl) was contained 20–40 ng of extracted DNA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl (Thermo Scientific), 3 mM MgCl₂ (Thermo Scientific), 1 mM of dNTPs (Thermo Scientific), 50 pM of each primer, 0.5 ml of Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). The PCR conditions were as follows: 10 min at 95 °C, then 35 cycles of 30 sec at 95 °C, 30 sec at 55 °C and 30 sec at 72 °C followed by a final elongation of 7 min at 72 °C.

Positive PCR products were purified and sent to MacroGen company for DNA sequencing. The raw sequence data were analysed using Geneious R11 (Kearse et al. 2012). The contigs were compared with all *Hysterothylacium* species sequences using the BLASTn algorithm via GenBank (Altschul et al. 1997). Pairwise distances using a Kimura 2-parameter and best of the nucleotide substitution model were calculated in MEGA 7.0 (Kumar et al. 2016). The TN93+G+I model for *rns* gene sequences was selected using Akaike Information Criterion. The *rns* datasets were used for maximum likelihood phylogenetic tree by bootstrap of 1000 replicates (Felsenstein 1985). The newly generated *rns* sequence was deposited in the GenBank under the accession number: MK886659.

RESULTS

The prevalence of the *Hysterothylacium* larvae in the Mediterranean Sea was detected as 10% (4/40) in *M. barbatus*. The morphology of selected specimens agrees well with the description of the fourth stage of *H. fabri* larvae (Figure 1).



Figure 1: Microphotographs showing main morphological features of *H. fabri* larvae from the Mediterranean Sea: (A) anterior end (scale: 200 μm), (B) posterior end (scale: 50 μm).

The final length of the contig nucleotide sequences of the *rns* and ITS gene regions were 490 bp and 955 bp, respectively. No intraspecific nucleotide differences were detected in the sequence analyses of partial *rns* and ITS region. Our *H. fabri* isolates displayed 98.90-100% identity to that of the ITS sequences of *H. fabri* (accession from JX974558, MH211474-94, MF539787-89, JQ520158, KU948632-37, KC852206) recorded previously from the Mediterranean Sea, South Korean waters, and Chinese waters (Chen et al. 2018; Pekmezci et al. 2014; Tedesco et al. 2018; Zhang et al. 2018). Moreover, our *H. fabri* isolates

(MK886659) showed 96.42% identity with *H. fabri* from China (MF140349) based on *rns* gene. The nucleotide difference based on *rns* gene between the Chinese isolate (MF140349) and our *H. fabri* isolate (MK886659) was determined as 3.2%. In phylogenetic analysis, our Mediterranean waters isolate of *H. fabri* (MK886659) and China isolate of *H. fabri* (MF140349) were also clustered together in the ML tree (Figure 2) according to *rns* dataset.

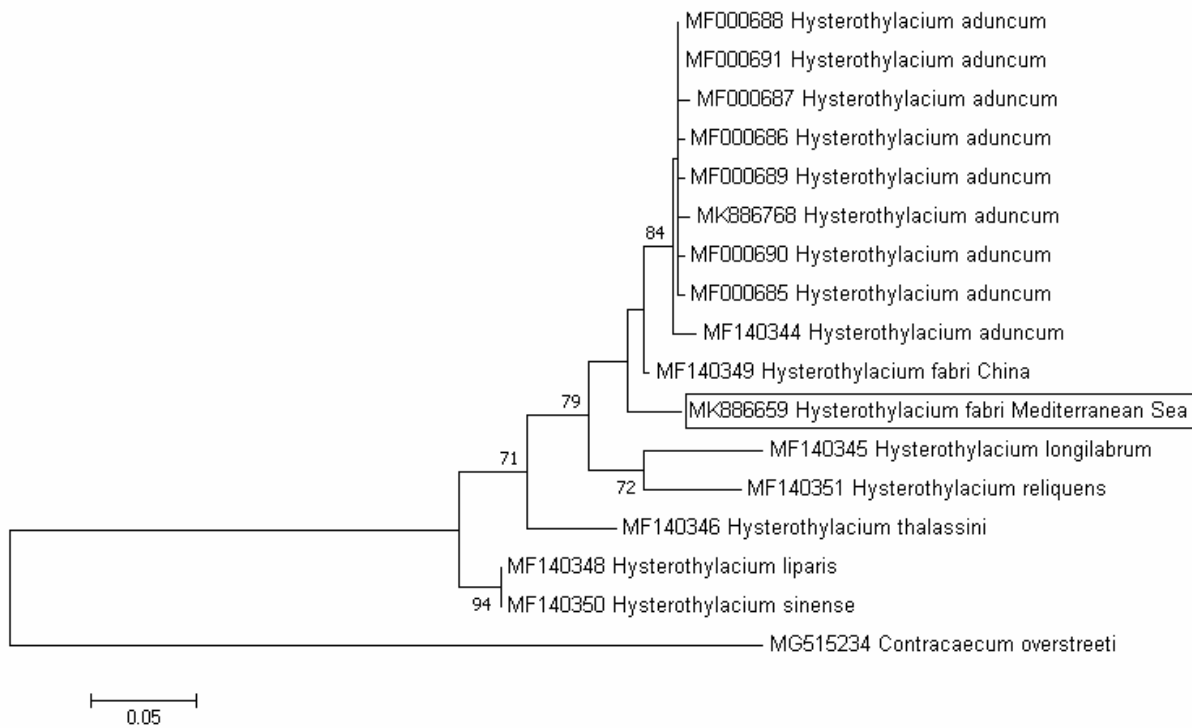


Figure 2: Phylogenetic relationships between our *H. fabri* (MK886659) isolate and other *Hysterothyliacium* species as inferred by maximum likelihood obtained from *rrnS* gene. The scale bar indicates the distance in substitutions per nucleotide. Bootstrap values were calculated over 1,000 replicates and percentages $\geq 70\%$ are shown at the internal nodes. *Contracaecum overstreeti* was used as out group.

DISCUSSION

The paper on morphological identification of *Hysterothyliacium* larvae published by Petter and Maillard (Petter and Maillard 1988) described the third (L3) and fourth (L4) stage of *H. aduncum* larvae, L3 and L4 of *H. fabri* larvae, L4 of *H. armoglossi* larvae and L3 and L4 of *Hysterothyliacium* sp. I and II larvae from the Mediterranean Sea. Recently, L3 and L4 stage and adult of *H. fabri* were also morphologically identified from the Mediterranean Sea (Tedesco et al. 2018). In the present study, our specimens were morphologically identified as L4 of *H. fabri* according to the identification key (Petter and Maillard 1988; Tedesco et al. 2018). Moreover, the morphological identification of *H. fabri* reported herein was also supported by molecular analyses. Our ITS regions sequence of L4 of *H. fabri* isolate displayed 98.90-100% identity (97% query cover) with the ITS sequences of *H. fabri* (JX974558, MH211474-94, MF539787-89, JQ520158, KU948632-37, KC852206) from the Mediterranean Sea, South Korean waters, and Chinese waters (Chen et al. 2018; Pekmezci et al. 2014; Tedesco et al. 2018; Zhang et al. 2018). Therefore, previously morphologically classified L4 of *H. fabri* larvae were also genetically confirmed as *H. fabri* based on the ITS regions. Herein, for the first time, we also determined the *rrnS* mitochondrial sequences of *H. fabri* from the Mediterranean waters. However, there

was one sequence for the *rrnS* gene of *H. fabri* (MF140349) recorded previously from China deposited in GenBank for comparison (Li et al. 2018). Interestingly, the 3.2% genetic distance was observed among *rrnS* sequences of *H. fabri* comparable to those reported (Li et al. 2018) and the present study. Nucleotide identity of the ribosomal and mitochondrial DNA higher than 96% for Anisakidae and Raphidascarididae are considered to be the same species (da Fonseca et al. 2016). Moreover, other known *H. aduncum* species exhibited low level of intraspecific nucleotide differences (p distance=0.004 to 0.009) between the Black Sea (MK886768) and the Mediterranean Sea isolates (MF000685-MF000691) for *rrnS* gene, whereas; high intraspecific genetic diversity (p distance=0.021) in the same species was also detected between Black Sea (MK886768) and China (MF140344) isolates (Pekmezci 2019). Therefore, the *rrnS* mitochondrial nucleotide differences between the China and our Mediterranean isolates of *H. fabri* should be considered as intraspecific nucleotide variation. Additionally, there may be intraspecific nucleotide differences between the remote communities of the same *Hysterothyliacium* species from different geographic area. Moreover, several authors accept *H. fabri* collected from marine fish in the Mediterranean and Chinese waters to be a complex comprising at least two or three sibling species (Guo et al. 2014; Martin-Sanchez et al. 2003).

In the present study, high nucleotide variability (3.2 % nucleotide difference) was detected in the *rrnS* sequences of Mediterranean (MK886659) and the China (MF140349) isolates of *H. fabri*. Thus, we also considered *H. fabri* as sibling species according to *rrnS* gene.

In conclusion, for the first time, we determined the mitochondrial *rrnS* data of *H. fabri* from the Mediterranean Sea in the present study. These molecular results provided species-specific genetic identification of *H. fabri* from the Mediterranean waters based on *rrnS* gene. More studies are needed to investigate the nucleotide variability by using various gene markers both larvae and adults of *Hysterothylacium* species from the Mediterranean waters.

Financial Support: This research received no grant from any funding agency/sector.

Ethics Committee Information: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

Conflict of Interest: The authors declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-402.
- Barcala E, Ramilo A, Ortega N, Pico G, Abollo E, Pascual S, Munoz P. Occurrence of *Anisakis* and *Hysterothylacium* larvae in commercial fish from Balearic Sea (Western Mediterranean Sea). *Parasitol Res.* 2018; 117:4003-4012.
- Chen HX, Zhang LP, Gibson DI, Lu L, Xu Z, Li HT, Ju HD, Li L. Detection of ascaridoid nematode parasites in the important marine food-fish *Conger myriaster* (Brevoort) (Anguilliformes: Congridae) from the Zhoushan Fishery, China. *Parasit Vectors.* 2018; 11:274.
- Costa A, Graci S, Cammilleri G, Buscemi MD, Collura R, Vella A, Ferrantelli V. Molecular identification of *Hysterothylacium* spp. in fishes from the Southern Mediterranean Sea (Southern Italy). *J Parasitol.* 2018; 104:398-406.
- D'Amelio S, Barros N, Ingrosso S, Fauquier D, Russo R, Paggi L. Genetic characterization of members of the genus *Contracaecum* (Nematoda: Anisakidae) from fish-eating birds from west-central Florida, USA, with evidence of new species. *Parasitology.* 2007; 134:1041.
- da Fonseca MCG, Knoff M, Felizardo NN, Di Azevedo MIN, Torres EJJ, Gomes DC, Iñiguez AM, de São Clemente SC. Integrative taxonomy of *Anisakidae* and *Raphidascarididae* (Nematoda) in *Paralichthys patagonicus* and *Xystreureys rasile* (Pisces: Teleostei) from Brazil. *Int J Food Microbiol.* 2016; 235:113-124.
- Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution.* 1985; 39:783-791.
- Gazzonis AL, Cavallero S, Zanzani SA, Olivieri E, Malandra R, Ranghieri V, D'Amelio S, Manfredi MT. *Anisakis* sp. and *Hysterothylacium* sp. larvae in anchovies (*Engraulis encrasicolus*) and chub mackerel (*Scomber colias*) in the Mediterranean Sea: Molecular identification and risk factors. *Food Control.* 2017; 80:366-373.
- Guo YN, Xu Z, Zhang LP, Hu YH, Li L. Occurrence of *Hysterothylacium* and *Anisakis* nematodes (Ascaridida: Ascaridoidea) in the tanaka's snailfish *Liparis tanakae* (Gilbert & Burke) (Scorpaeniformes: Liparidae). *Parasitol Res.* 2014; 113:1289-300.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics.* 2012; 28:1647-9.
- Keskin E, Koyuncu CE, Genc E. Molecular identification of *Hysterothylacium aduncum* specimens isolated from commercially important fish species of Eastern Mediterranean Sea using mtDNA *cox1* and ITS rDNA gene sequences. *Parasitol Int.* 2015; 64:222-228.
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33:1870-4.
- Li L, Lü L, Nadler SA, Gibson DI, Zhang LP, Chen HX, Zhao WT, Guo YN. Molecular phylogeny and dating reveal a terrestrial origin in the Early Carboniferous for ascaridoid nematodes. *Syst Biol.* 2018; 67:888-900.
- Martin-Sanchez J, Diaz M, Artacho ME, Valero A. Molecular arguments for considering *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) a complex of sibling species. *Parasitol Res.* 2003; 89:214-20.
- Moravec F, Justine JL. Anisakid nematodes (Nematoda: Anisakidae) from the marine fishes *Plectropomus laevis* Lacepede (Serranidae) and *Sphyræna genie* Klunzinger (Sphyrænidae) off New Caledonia, including two new species of *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917. *Syst Parasitol.* 2015; 92:181-95.
- Pekmezci GZ. Molecular characterization of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae infecting *Merlangius merlangus euxinus* (Linnaeus, 1758) from the Turkish Black Sea coast based on mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene analysis. *Etlık Vet Mikrobiol Derg.* 2019; 30:64-69.
- Pekmezci GZ, Yardimci B, Onuk EE, Umur S. Molecular characterization of *Hysterothylacium fabri* (Nematoda: Anisakidae) from *Zeus faber* (Pisces: Zeidae) caught off the Mediterranean coasts of Turkey based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Parasitol Int.* 2014; 63:127-31.
- Petter AJ, Maillard C. Larves d'ascarides parasites de poissons en Méditerranée occidentale. *Bull Mus Natl Hist Nat.* 1988; 10:347-369.
- Roca-Gerones X, Montoliu I, Godinez-Gonzalez C, Fisa R, Shamsi S. Morphological and genetic characterization of *Hysterothylacium* Ward & Magath, 1917 (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in horse mackerel, blue whiting and anchovy from Spanish Atlantic and Mediterranean waters. *J Fish Dis.* 2018; 41:1463-1475.
- Simsek E, Ciloglu A, Yildirim A, Pekmezci GZ. Identification and molecular characterization of *Hysterothylacium* (Nematoda: Raphidascarididae) larvae in bogue (*Boops boops* L.) from the Aegean Sea, Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2018; 24.
- Szostakowska B, Myjak P, Kur J, Sywula T. Molecular evaluation of *Hysterothylacium auctum* (Nematoda, Ascaridida, Raphidascarididae) taxonomy. *Acta Parasitol.* 2001; 46:194-201.
- Tedesco P, Gustinelli A, Caffara M, Patarnello P, Terlizzi A, Fioravanti ML. *Hysterothylacium fabri* (Nematoda:

Raphidascarididae) in *Mullus surmuletus* (Perciformes: Mullidae) and *Uranoscopus scaber* (Perciformes: Uranoscopidae) from the Mediterranean. J Parasitol. 2018; 104:262-274.

Zhang K, Xu Z, Chen HX, Guo N, Li L. Anisakid and raphidascaridid nematodes (Ascaridoidea) infection in the important marine food-fish *Lophius litulon* (Jordan) (Lophiiformes: Lophiidae). Int J Food Microbiol. 2018; 284:105-111.

Zhu X, Gasser RB, Podolska M, Chilton NB. Characterisation of anisakid nematodes with zoonotic potential by nuclear ribosomal DNA sequences. Int J Parasitol. 1998; 28:1911-21.

Comparison of The Plant Heights and Relative Feed Values of Triticale and Vetch Mixtures Produced by a Hydroponic System

Mine AKMAN¹, Şenol GÜZEL², Hıdır GÜMÜŞ^{3*}

¹Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur Food Agriculture and Livestock Vocational School, Department of Plant and Animal Production, Horticulture Program, Burdur, Turkey

²Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Science and Literature, Department of Molecular Biology and Genetics, Burdur, Turkey

^{3*}Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Burdur, Turkey

ABSTRACT

This study was carried out to determine the effects of adding vetch seeds to triticale seeds at different ratios (100% triticale, T100; 90% triticale + 10% vetch, TV10; 80% triticale + 20% vetch, TV20; 70% triticale + 30% vetch TV30) on the shoot and root lengths values and relative feed value of green fodder produced by a hydroponic system. For this purpose, two cereal types (Triticale and vetch), six harvest times (3, 4, 5, 6, 7 and 8 days) and addition of liquid fertilizers (LF-; LF+) were evaluated to determine green fodder production performance. The group harvested TV20% with liquid fertilizer provided the highest triticale shoot height and root length values. The liquid fertilizer (P=0.004), days (P<0.001) and their interaction (P=0.004) significantly influenced the triticale shoot height value. The lowest shoot height and root length values of triticale were obtained in the T100% group. The vetch shoot height and root length values had the greatest improvements for the TV20% group with liquid fertilizer and the least for the TV10% group without liquid fertilizer. The highest value was found in the group of TV20% (P<0.01) with liquid fertilizer, and the lowest value was in the group of T100% without liquid fertilizer in terms of the relative feed value (RFV) of green fodder. As a result, the TV20% group with liquid fertilizer showed better green fodder performance than the other groups.

Keywords: Hydroponic system, Green fodder, Triticale, Vetch

Hidroponik Sistemde Üretilen Tritikale ve Fiğ Karışımlarının Bitki Boyları ile Nispi Yem Değerlerinin Karşılaştırılması

ÖZ

Bu araştırma hidroponik sistemde üretilen tritikale tohumuna farklı oranlarda ilave edilen fiğ tohumlarının (%100 tritikale, T100; %90 tritikale + %10 fiğ, TF10; %80 tritikale + %20 fiğ, TF20; %70 tritikale + %30 fiğ, TF30) yeşil hasıl sürgün ve kök boy değerleri ile nispi yem değerleri üzerine etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hasıl üretim performansını belirlemede iki tür tane yem (Tritikale ve fiğ), altı farklı hasat zamanı (3, 4, 5, 6, 7 ve 8 günleri) ve sıvı gübre ilavesi (G-;G+) değerlendirilmiştir. Hasat edilen sıvı gübreli TV20% grubu en yüksek sürgün ve kök boyu değerlerini vermiştir. Sıvı gübre (P=0.004), günler (P<0.001) ve interaksyonları (P=0.004) tritikalenin sürgün boyu değerlerini önemli derecede etkilemiştir. Tritikalenin en düşük sürgün ve kök boyu değerleri T100% grubunda elde edilmiştir. Fiğin sürgün ve kök boyu değerleri en fazla sıvı gübreli TV20% grubunda, en az sıvı gübresiz TV10% grubunda olmuştur. Yeşil hasıl nispi değerleri (NYD) bakımından en yüksek TV20% grubunda en düşük ise T100% grubunda bulunmuştur. Sonuç olarak, yeşil hasıl performansı bakımından sıvı gübreli TV20% grubunun diğer gruplara göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Hidroponik sistem, Yeşil hasıl, Tritikale, Fiğ

To cite this article: Akman M, Güzel Ş, Gümüş H. Comparison of The Plant Heights and Relative Feed Values of Triticale and Vetch Mixtures Produced by a Hydroponic System. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):77-82

Submission: 13.01.2021 Accepted: 18.02.2021 Published Online: 20.02.2021

ORCID ID: MA: 0000-0001-6521-8420, ŞG: 0000-0002-5811-7979, HG: 0000-0001-7077-1036

*Corresponding author e-mail: hgumus@mehmetakif.edu.tr

INTRODUCTION

A hydroponic system is a method of growing plants without soil (Sarıççek et al. 2018). It was first applied in 1860 in England under the name of "Nutriculture", as an alternative to traditional agriculture. The efficiency of soilless agriculture technology at every moment of the year is widely used in agriculture and livestock businesses today (Sneath and McIntosh 2003, Hussain et al. 2014). Soil or a nutrient medium is not used in hydroponic systems or incubation rooms to produce green feeds. The appropriate light, temperature, humidity, etc. are necessary for adequate germination. When the conditions are met, it is possible to produce green feeds (Kılıç 2016, Sneath and McIntosh 2003). The roots interlock and take the appearance of a carpet after the grains are germinated. The green parts reach 20-25 cm in 6-8 days, and 6-10 times more green fodder can be obtained (Sneath and McIntosh 2003, Sarıççek et al. 2018). Soil-supported cultivation of crops requires a lot of tools and equipment, labor, time and a large area, and there are also risks arising from climatic conditions. It is possible to obtain grass in a few days with hydroponic systems in a germination machine (Sarıççek et al. 2018). It has been reported in some studies that the nutritional values of green feeds grown were the best on the 7th day (Akbağ et al. 2014, Saidi and Omar 2015). After that day, energy levels and organic matter contents decreased, and the amount of structural carbohydrates increased (Gebremedhin et al. 2015, Kardeşahin 2014, Fazaeli et al. 2012). During the germination process, with conversion of starch to sugar, the ash content of crops increases, and the dry matter and starch levels decrease (Peer and Leeson 1985). The yield and quality of the green feed that is produced depend on the grain type and quality, temperature, fertilizer contribution, moistening time and thickness and density of the grain spread on the tray (Sarıççek et al. 2018). Green feed produced in hydroponic systems has a disadvantage of a high water ratio, and it may pose a risk of mold and fungus development (Sarıççek et al. 2018). Especially in ruminant feeding, the low dry matter content may be a limiting factor (Gümüş and Bayır 2020). Although barley is a commonly used grain feed in this system (Emam 2016, Fazeli et al. 2011, Fazali et al. 2012, Kardeşahin 2016), there also have been studies on the nutritional values and plant heights of green feeds produced with sorghum, wheat (Al-Karaki and Al-Hasimi 2012) or oats (Gümüş and Bayır 2020). However, the feed quality is generally determined according to their physical appearance and chemical rate, and the relative feed value (RFV) (Moore and Undersander 2002).

This study was carried out to investigate the effects of adding different amounts of protein-rich vetch seeds

to triticale seeds, and to determine the day-to-day changes in the plant height and relative feed values of

green fodder and increase the values with inorganic fertilizers.

MATERIAL and METHOD

The research was conducted in a steel hydroponic chamber within the Agriculture, Livestock and Food Research and Application Center of MAKU. This chamber was composed of two blocks; each block consisted of 7 shelves and 2 rows. Each block of the chamber unit contained 98 acrylonitrile butadiene styrene trays to produce green fodder. A temperature of 18-19 °C, relative humidity of 60%, lighting time and light color of 12 hours and yellow light, irrigation time and frequency of 90 seconds 120⁻¹ minute, and liquid fertilizer (NPK) amount of 675 ppm were applied during the study, and the growing period was designed as 8 days. The contents of the green feed production cabin, irrigation system, trays and necessary tools were disinfected with 10% formaldehyde before planting. To minimize the risk of mold formation, 50 ml of sodium hypochlorite was added to the irrigation water every day. Tap water was used as a source of the irrigation system. Seeds were pre-soaked for 24 hours to accelerate germination. This study evaluated two forage crops which were triticale (*Triticosecale Wittmack*) and vetch (*Vicia sativa L.*). The effects of the treatments (100% triticale, T100; 90% triticale + 10% vetch, TV10; 80% triticale + 20% vetch, TV20; 70% triticale + 30% vetch TV30), with liquid fertilizing (TV10%+LF, TV20%+LF, TV30%+LF) or without liquid fertilizing (TV10%-LF, TV20%-LF, TV30%-LF) and different growing times (3rd, 4th, 5th, 6th, 7th and 8th days) on the green fodder shoot heights, root lengths and relative feed values were examined in the study. The seeding rate applied in this study was about 1000 g/tray. The trays were imbedded on the shelves of the hydroponic chamber. All experiments were carried out with 4 replicates. A total of 32 trays (4 groups x 4 subgroups x 2 with/without liquid fertilizer) were used in the steel hydroponic chamber. The shoot heights and root lengths of 6 green feeds randomly selected from each group were measured using a tape measure until the harvest day (day 8th) to determine the growth rate. The relative feed value (RFV) of the green feeds was calculated according to the method described by Rocateli and Zhang (2014).

The data was evaluated using the MIXED procedure of SAS (version 9.4, SAS Institute, Carry, NC) with the fixed effects of treatment, day, fertilizer, and their two- and three-way interactions. Each sample was included as random effects. The PDIF statement was used for multiple comparisons as a post-hoc test. All data are reported as least square means with SEM

in tables via LSMEANS statement. The significance level was assumed at $P < 0.05$ for main effects.

RESULTS

The highest triticale shoot height value was found in TV20%+LF, and the lowest was in TV30%-LF. The liquid fertilizer ($P=0.004$), days ($P<0.001$) and their interaction ($P=0.004$) significantly influenced the triticale shoot height value. The triticale root length reached the highest value with a mean of 6.851 cm in the TV20%+LF group, while the TV30%-LF reached the lowest root length value with a mean of 6.236 cm. There were significant effects of the treatments ($P=0.002$) and days ($P<0.001$) for the triticale root length, and there was no significant interaction effect ($P=0.37$). In the meantime, the shoot height and root length values of the vetch were found to be lower in all groups in comparison to the triticale. The vetch's green fodder was examined in terms of shoot height, while the highest value was found as 3.0 cm in the group of TV30%+LF, and the lowest value was found as 2.853 cm in the group of TV10%-LF. The vetch's roots length in the TV20%+LF group was the highest among all groups. The days significantly influenced the vetch shoot height and root length ($P<0.001$). Neither the treatments ($P=0.05$) nor the interaction of the treatments and days ($P=0.05$) significantly affected the vetch's shoot height and root length values. The highest value was found in the group of TV20%+LF ($P<0.01$), and the lowest value was in the group of TV10%-LF in terms of the relative feed value (RFV).

DISCUSSION

Alternative methods are being developed to meet the lack of quality roughage in Turkey. As an alternative to traditional agriculture, fresh green fodder can be produced 365 days a year regardless of the climatic conditions in hydroponic farming systems (Kılıç 2016). A green fodder production chamber is a closed system. Environment parameters such as temperature, humidity, lighting values, the pH and EC values of water, and the pressure of the irrigation system can be adjusted in hydroponic systems according to the desired values. These parameters are important for a healthy plant and faster growth. Green fodder production rooms are harvested by up to 15-20 cm daily (Palande et al. 2017). The results of this study showed that the mean shoot height and root length values of the triticale green fodder in the TV20%+LF treatment were significantly higher than those in the TV10% and TV30% treatments. The highest mean green fodder root length value was recorded in TV20%+LF, followed by TV30%+LF and TV10%+LF (Table 1). In a study conducted by Emam (2016) with barley (*Giza 127 variety*) green fodders, it was stated that the harvest reached a shoot height of 10.10 cm at day 7 of harvesting. The shoot

heights of the triticale and vetch green fodder in this study ranged between 11.55 cm and 6.85 for TV20%+LF at day 8 of harvesting. Gümüş and Bayır (2020) reported that the green fodder height of barley was 17.75 cm, and the green fodder height of the oat was 12.22 cm at day 7 of harvesting in a hydroponic chamber system. Saha et al. (2016) determined the height value of a plant in an aquaponic system as 14% higher than produced in a hydroponic system in their study. Natsheh (2020) stated that the salinity in tap water also showed an important succession rate in shoot height with an increase tendency from 15 to 20.19 cm at the end of their study. It was found that green fodders of barley, corn and wheat produced in a hydroponic chamber system showed the shoot height and root length measures of 17.00 and 12.00 cm, 15.00 and 15.00 cm and 10.80 and 5.80 cm, respectively, and significant differences were found among the tested green fodders (Karaşahin 2015). In this study, the effects of the liquid fertilizer applications on the shoot height of the triticale green fodder were found to be statistically significant in comparison to the control group. The outcome of the current study was in agreement with Karaşahin (2016), who stated that the height of corn green fodder produced in a hydroponic chamber system increased by approximately 38% with the use of fertilizers. As expected, the liquid fertilizer affected the shoot heights and root lengths in this study. The vetch structure is prone to bending problems in field studies, and it has been proposed to grow vetch with grains such as barley, wheat, triticale (Acar et al. 2017), oats and rye (Yolcu et al. 2009, Aşçı et al. 2020). In this study, the best root length value for the triticale and vetch was found in the TV20%+LF group. Kuşan et al. (2019) stated that the heights of the green fodder of triticale, barley, wheat, oat and rye were measured as 16.08 cm, 17.47 cm, 14.21 cm, 13.90 and 11.67 cm, respectively, on the 8th day in a hydroponic chamber system. The vetch shoot height value had the greatest improvements for TV20%+LF and the least for TV10%-LF. We think that the shoot height responded to the vetch amount, such that, the shoot heights were increased by increasing the application of the vetch amount in the treatments. During the present experiment, it was determined that the shoot height and root length values of the vetch irrespective of liquid fertilizer were lower than the triticale shoot height and root length values. Addition of the liquid fertilizer insignificantly increased the shoot height and root length values of the vetch green fodder. Similar findings were reported by Karaşahin (2017), who found that growing barley green fodder with (*Hordeum vulgare L.conv. distichon, two-row barley*) an inorganic fertilizer and an organic fertilizer had an insignificant effect on the shoot heights and root lengths. RFV is widely used by the United States to measure the feed value of alfalfa. For alfalfa in full bloom, the RFV value is taken as 100, and the quality of the feed falls below this value. At

the end of the experiment, the RFV value was found to be the highest in the TV20%+LF group to which the liquid fertilizer was added, whereas it was the lowest in the T100%-LF group. Gümüş and Bayır (2020) stated that the highest RFV of barley and oat

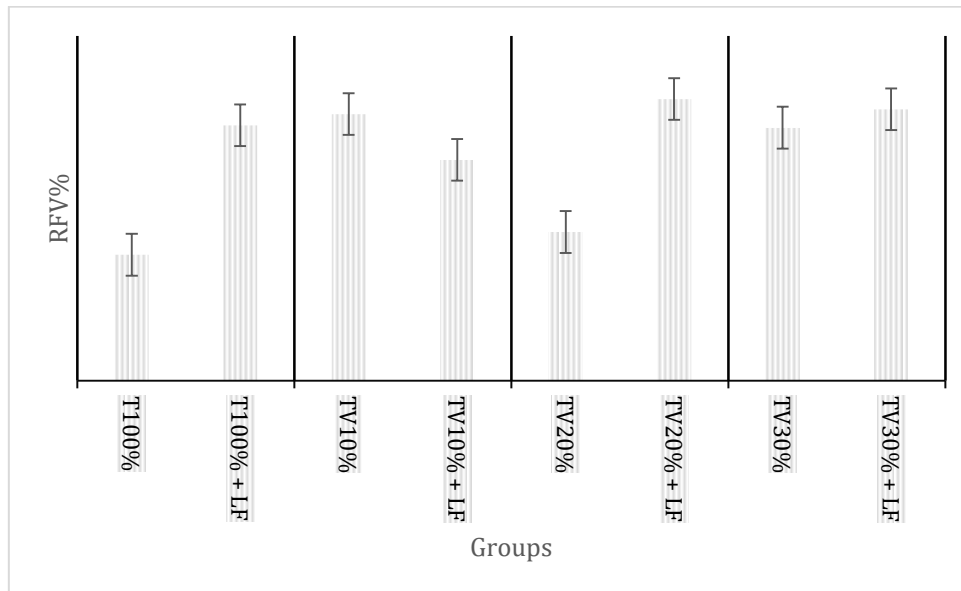
green fodders produced in a hydroponic system was found in the barley green fodder. In a comparison of a hydroponic system and a soil system conducted by Sarıççek et al. (2018), it was identified that the highest RFV was in the hydroponic system.

Table 1. Shoot height and root length of green fodders

Tablo 1. Yeşil hasılların sürgün ve kök uzunlukları

Groups	T100%	TV10%	TV20%	TV30%	SEM	T	LF	D	TxD	TxLF	TxDxLF
<i>Triticale</i>	LF- LF+	LF- LF+	LF- LF+	LF- LF+							
SH	6.389 6.715	6.529 6.625	6.506 6.772	6.350 6.725	0.109	0.93	0.004	<.0001	0.37	0.39	0.004
RL	6.261 6.304	6.315b 6.319b	6.583a 6.851a	6.236b 6.516b	0.114	0.002	0.06	<.0001	0.71	0.38	0.12
<i>Vicia S.</i>	LF- LF+	LF- LF+	LF- LF+	LF- LF+							
SH	- -	2.853 2.931	2.906 2.919	2.969 3.000	0.06	0.29	0.83	<.0001	0.01	0.64	0.84
RL	- -	4.152b 4.272b	4.327ab 4.485ab	4.397a 4.465a	0.09	0.05	0.92	<.0001	0.05	0.48	0.16

T100%: Triticale 100%, TV10: Triticale 90%+ Vetch 10%, TV20: Triticale 80%+Vetch 20%, TV30: Triticale 70%+Vetch 20% SH: Shoot height, RL: Root length
T: Treatments, LF: Liquid fertilizer, D: Days, TxD: Treatments x Days, TxLF: Treatments x Liquid fertilizer, TxDxLF: Treatments x Days x Liquid fertilizer



T100%: Triticale 100%, TV10: Triticale 90%+ Vetch 10%, TV20: Triticale 80%+Vetch 20%, TV30: Triticale 70%+Vetch 20%, LF: Liquid fertilizer

Figure 1. Relative feed values of green fodders
Şekil 1. Yeşil hasılların nispi yem değerleri

CONCLUSION

Using a hydroponic chamber system is a technique for germinating seeds such as wheat, barley and maize to produce a high nutritional value in fodder used in animal nutrition. In terms of animal nutrition, using green fodder could be a limiting factor because of its low-level dry matter. This approach may be incorrect in based on the comparison of green fodder and seeds in terms of dry matter. As a result, green fodder, which has been recommended as alternative forage, is used in animal nutrition, especially in the winter season. The shoot height and root length values of green fodder affect the nutritional values of green fodder such as dry matter, crude protein, NDF and ADF. Based on the results of this study, the TV20+LF group showed better shoot height, root length and RFV results under the hydroponic chamber system than the other groups. Regardless of the group, addition of the liquid fertilizer had numerically greater shoot height and root length value improvements than the groups without addition of the liquid fertilizer. Seed type, mixing ratios of seeds, harvest time and quantity of liquid fertilizer could have affected the hydroponic performance. So, more studies are needed to investigate the hydroponic performance of producing different seeds under a hydroponic chamber system.

Acknowledgements

This research article was summarized from the first author's master thesis. The author wishes to thank Dr. Eyüp Eren Gültepe for their advice on statistical analysis.

Ethical Statement

This study does not present any ethical concerns.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Acar Z, Gulumser E, Asci OO, Basaran U, Mut H.** Effects of sowing ratio and harvest periods on hay yields, characteristics of hungarian vetch-cereal mixtures. *Legume Res.* 2017; 40(4):677-683.
- Akbağ HI, Türkmen OS, Baytekin H, Yurtman İY.** Effect of harvesting time on nutritional value of hydroponic barley production. *Turk J Agric Nat Sci.* 2014; Special Issue 2.
- Al-Karaki GN, Al-Hashimi M.** Green fodder production and water use efficiency of some forage crops under hydroponic conditions. *ISRN Agronomy.* 2012; 10:1-5.
- Aşçı ÖÖ, Demirkol G, Arıcı YK.** Macar fiği kolza karışımlarının ot verimi, kalitesi ve bitkiler arasındaki rekabet

- bakımından değerlendirilmesi. *Akademik Ziraat Derg.* 2020; 9(1):119-128.
- Emam MSA.** The sprout production and water use efficiency of some barley cultivars under intensive hydroponic system. *Middle East J Agric Sci.* 2016; 5(2):161-170.
- Fazaeli H, Golmohammadi HA, Shoayee AA, Montajebi N, Mosharraf SH.** Performance of feedlot calves fed hydroponics fodder barley. *J Agric Sci Tech.* 2011; 13:367-375.
- Fazaeli H, Golmohammadi HA, Tabatabayee SN, Asgari-Tabrizi M.** Productivity and nutritive value of barley green fodder yield in hydroponic system. *World Applied Sci J.* 2012; 16(4):531-539.
- Gebremedhin WK, Deasi BG, Mayekar AJ.** Nutritional evaluation of hydroponically grown barley fodder. *J Agric Egn Food Tech.* 2015; 2(2):86-89.
- Gumus H, Bayır AM.** Hasılatikte üretilen arpa ve yulaf yeşil hasılımın farklı günlerdeki besin madde değerleri. *MAKU J Health Sci Inst.* 2020; 8(2):30-36.
- Hussain A, Iqbal K, Aziem S, Mahato P, Negi AK.** A review on the science of growing crops without soil (soilless culture) a novel alternative for growing crops. *J Agron Crop Sci.* 2014; 7(11): 833.
- Karavaşahin M.** Kaba yem kaynağı olarak hidroponik arpa çimi üretiminde kuru madde ve ham protein verimleri üzerine farklı uygulamaların etkileri. *Süleyman Demirel Üniv Ziraat Fak Derg.* 2014; 9(1):27-33.
- Karavaşahin M.** Topraksız ortamda yetiştirilen bazı tahılların çim suyu verim ve besin değerleri. *Iğdır Üniv Fen Bil Enst Derg.* 2015; 5(4):57-64.
- Karavaşahin M.** Farklı gübreleme uygulamalarının hidroponik mısır (*Zea mays l. indentata s.*) çimi üzerine etkileri. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi.* 2016; 9(1):29-32.
- Karavaşahin M.** Farklı gübreleme ve yetiştirme süresi uygulamalarının hidroponik arpa (*Hordeum vulgare L. conv. distichon*) çimi üzerine etkileri. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2017; 7(1):39-46.
- Kılıç Ü.** Kaba yem üretiminde hidroponik tarım sistemleri. *Türk Tarım Gıda Bil Tekn Derg.* 2016; 4(9):793-799.
- Kuşan O, Çayan H, Şahin A.** Dry matter content of different feed grains germinated by hydroponics method. XI. *International Animal Science Conference.* 2019; October 20-22, Nevşehir, Turkey
- Moore JE, Undersander DJ.** Relative forage quality: an alternative to relative feed value and quality index. In *Proceedings of the 13th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium.* 2002; January 10-11, Gainesville.
- Natsheh B.** Barley green fodder production and effect of different saline water levels under hydroponic condition. *Proceedings of the 6th International Conference on Agriculture.* 2020; 2:12-19.
- Palande V, Zaheer A, George K.** Fully automated hydroponic system for indoor plant growth. *Procedia Comput Sci.* 2017; 129:482-488.
- Peer DJ, Leeson S.** Feeding value of hydroponically sprouted barley for poultry and pigs. *Anim Feed Sci Tech.* 1985; 13:183-190.
- Rocateli D, Zhang H.** Forage quality interpretations. *Oklahoma Cooperative Extension Service,* 1-6. Accession: <http://pods.dasn.okstate.edu/docushare/dsweb/Get/Document-2557/F-2117web.pdf>; Accession date: 02.03.2020.

- Saha S, Monroe A, Day MR.** Growth, yield, plant quality and nutrition of basil (*ocimum basilicum* L.) under soilless agricultural systems. *Ann Agr Sci.* 2016; 61:181-186.
- Saidi ARM, Omar JA.** The biological and economical feasibility of feeding barley green fodder to lactating awassi ewes. *Open J Anim Sci.* 2015; 5(2):99-100.
- Sarıççek BZ, Yıldırım B, Hanoğlu H.** Hidroponik ve topraklı sistemle yetiştirilen arpa ve yeşil yemi ile silajının besin madde kompozisyonu ve nispi yem değerinin karşılaştırılması. *BSJ Agri.* 2018; 1(4):102-109.
- Sneath R, McIntosh F.** Review of hydroponic fodder production for beef cattle, hydroponic fodder review. Meat & Livestock Australia, Department of Primary Industries. 2003; Project number NBP.332.
- Yolcu H, Polat M, Aksakal V.** Morphologic, yield and quality parameters of some annual forages as sole crops and intercropping mixtures in dry conditions for livestock. *J Food Agric Environ.* 2009; 7:594-599.

The Effect of Carprofen Treatment on Conception Rate After Insemination in Cows with Increased Days in Milk

Hasan ALKAN^{1*}, Fatma SATILMIŞ¹, Ömer Faruk YEŞİLKAYA¹, Muhammed Furkan ÇİFTÇİ¹, Kübra KARAKAŞ ALKAN¹, Hüseyin ERDEM¹

¹Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 42250, Konya, Turkey

ABSTRACT

In this study the effect of carprofen treatment on conception rate after insemination in Holstein cows that did not conceive for a long time after parturition was evaluated. In the study, 200 Holstein cows with days in milk >120 were used. A progesterone + ovsynch-based estrus synchronization protocol was applied to the cows included in the study. For this purpose, the progesterone device was placed intravaginally together with GnRH injection. Seven days later, the progesterone source was removed from the vagina and PGF_{2α} injection was administered. GnRH injection was administered 48 hours following PGF_{2α} injection and fixed-time insemination was performed 12-16 hours later. After insemination, animals were randomly divided into 2 groups. Subcutaneous carprofen was applied to the carprofen group (n = 100) on the 14th day after insemination and physiological saline was applied to the control group (n = 100) on the same day. Three cows from the carprofen group and 5 cows from the control group were excluded from the study for various reasons. The pregnancy rate was 42.26% (41/97) in the carprofen group and 25.26% (24/95) in the control group (p <0.05). However, the rate of conception was found to be the lowest (10.52%) in cows with high milk yield (>30 kg) in the control group. In addition, it was found that carprofen administration to cows with high milk yield increased the rate of conception. However, it was determined that the days in milk had no effect on pregnancy rate. As a result, it was concluded that the administration of carprofen on the 14th day after insemination to cows who could not conceive for a long time after parturition may be effective in increasing the rate of conception.

Keywords: Carprofen, cow, days in milk, milk yield, pregnancy rate.

Sağımda Geçen Gün Süresi Artmış Olan İneklere Tohumlama Sonrası Karprofen Uygulamasının Gebe Kalma Oranı Üzerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışmada doğumdan sonra uzun süre gebeliğin sağlanamadığı Holstein ırkı ineklerde, tohumlama sonrası karprofen uygulamasının gebe kalma oranı üzerine etkisi değerlendirilmiştir. Çalışmada sağımda geçen gün süresi >120 gün olan 200 Holstein ırkı inek kullanıldı. Çalışmaya dahil edilen ineklere progesteron+ovsynch esaslı östrüs senkronizasyon protokolü uygulandı. Bu amaçla GnRH enjeksiyonu ile birlikte progesteron kaynağı intravaginal olarak yerleştirildi. Yedi gün sonra progesteron kaynağı vaginadan uzaklaştırıldı ve PGF_{2α} enjeksiyonu yapıldı. PGF_{2α} enjeksiyonundan 48 saat sonra GnRH enjeksiyonu uygulandı ve 12-16 saat sonra ineklere sabit zamanlı tohumlama yapıldı. Tohumlama sonrası hayvanlar rastgele olarak 2 gruba ayrıldı. Karprofen grubuna (n=100) tohumlama sonrası 14. gün deri altı karprofen ve kontrol grubuna (n=100) ise aynı gün fizyolojik tuzlu su uygulandı. Karprofen grubundan 3 ve kontrol grubundan ise 5 inek çeşitli nedenlerle çalışmadan çıkarıldı. Gebe kalma oranı; karprofen grubunda %42,26 (41/97), kontrol grubunda ise %25,26 (24/95) olarak belirlendi (p<0,05). Bununla birlikte kontrol grubunda yüksek süt verimli (≥30 kg) ineklerde gebe kalma oranları en düşük (%10,52) bulundu. Ayrıca yüksek süt verimli ineklere karprofen uygulamasının gebe kalma oranını artırdığı tespit edildi. Ancak sağımda geçen gün süresinin gebelik oranı üzerine etkisinin olmadığı belirlendi. Sonuç olarak doğumdan sonra uzun bir süre gebe kalamamış ineklere, tohumlama sonrası 14. günde karprofen uygulamasının gebe kalma oranını artırmada etkili olabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Gebelik oranı, inek, karprofen, sağımda geçen gün süresi, süt verimi.

To cite this article: Alkan H, Satılmış F, Yeşilkaya Ö.F, Çiftçi M.F, Karakaş Alkan K, Erdem H. The Effect of Carprofen Treatment on Conception Rate After Insemination in Cows with Increased Days in Milk. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):83-90

Submission: 29.12.2020 Accepted: 11.02.2021 Published Online: 21.02.2021

ORCID ID: H.A: 0000-0001-8332-5334, F.S: 0000-0002-9877-8405, Ö.F.Y: 0000-0002-7721-2576, M.F.Ç: 0000-0001-8333-6500, K.K.A: 0000-0001-9177-9299, H.E: 0000-0002-1416-5354

*Corresponding author e-mail: hasanalkan@selcuk.edu.tr

GİRİŞ

İneklerde yapılan ıslah çalışmaları ve geliştirilen biyoteknolojik yöntemler sayesinde süt verim düzeylerinde önemli artışlar sağlanmasına rağmen fertilité parametrelerinde aynı başarı elde edilememiştir. En önemli fertilité parametresi her inekten yılda bir kez sağlıklı buzağı elde edilmesidir. Bunun gerçekleşebilmesi için başarılı bir doğum (0. gün), sorunsuz bir postpartum dönem (0-42. gün) ve ilerleyen dönemde (42-90. gün) gebeliğin tekrardan sağlanması gerekmektedir. Ancak çoğu sütçü inek işletmesinde bu şartlar sağlanmadığı için doğum-gebe kalma aralığı uzamakta ve gebelik başına düşen tohumlama sayısı artmaktadır. Dolayısıyla gebelik başına düşen maliyetin artması veya gebeliğin elde edilememesine bağlı olarak, ineğin damızlık değerinin düşmesi günümüz süt sığırcı işletmelerinin en önemli ekonomik sorunu haline gelmiştir (Bartlett ve ark. 1986, Dochi ve ark. 2008, Perez-Marin ve ark. 2012). Embriyonik ölümlerin sütçü ineklerin doğumdan sonra istenilen aralıklarda gebe kalamamasında önemli bir sebep olduğu bildirilmektedir (Santos ve ark. 2004, Diskin ve ark. 2016). Yapılan çalışmalarda bu ölümlerin büyük bir kısmının ilk birkaç hafta içerisinde meydana geldiği tespit edilmiştir. Özellikle gebelik kayıplarının %70-80'i gebeliğin 8-16. günleri arasında meydana gelmektedir (Thatcher ve ark. 1994, Santos ve ark. 2004, Diskin ve ark. 2012, Diskin ve ark. 2016). Bu ölümlerin önlenmesi veya azaltılması amacıyla birçok çalışma yapılmakta ve elde edilen verilere göre çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerden birisi de suni tohumlama sonrası nonsteroid antiinflatuvar ilaç uygulamasıyla annenin luteolitik cevabının azaltılmasına yöneliktir (Binelli ve ark. 2001, Dursun 2011). Son yıllarda fertilitenin artırılmasına yönelik yapılan çalışmalarda (Güzeloğlu ve ark. 2007, Erdem ve Güzeloğlu 2010, von Krueger ve Heuwieser 2010) nonsteroid antiinflatuvar ilaçlar ile COX enzimi inhibe edilerek, endometriyumdan PGF_{2α} salınımının baskılanması amaçlanmıştır. Böylece korpus luteumun lize olması engellenerek korpus luteumun yaşam ömrü uzatılmaya çalışılmakta ve zayıf/yavaş gelişen embriyoların gelişimlerinin devamlılığı sağlanarak embriyonun yeterli interferon tau (IFN-τ) salınımını gerçekleştirmesi hedeflenmektedir. Bu sayede gebe kalma oranları artırılmaya çalışılmaktadır (Young 2004). Sunulan çalışmada bu hedefe yönelik olarak; doğumdan sonra uzun süre gebe kalmamış Holstein ırkı ineklere, tohumlama sonrası karprofen uygulamasıyla gebe kalma oranının artırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Sunulan çalışma, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun onayı ve izniyle yürütüldü.

Hayvan Materyali

Çalışmada en az bir kez doğum yapmış, 2-6 yaşlı, seksüel siklusları düzenli olan ve genital sisteminde anatomik ve makroskopik herhangi bir sorun tespit edilmeyen, 200 Holstein ırkı inek kullanıldı. Çalışmaya sağında geçen gün süresi 120 günden fazla olan inekler dahil edildi.

Belirlenen kriterler doğrultusunda seçilen ineklere rektal muayene ve ultrasonografik muayene (6,0 MHz linear prob, Falcovet, Pie Medical, Hollanda) yapılarak ovaryum, ovidukt, uterus ve serviks değerlendirildi (Mortimer ve ark. 1997). Genital organlarında herhangi bir sorun tespit edilmeyen, ovaryumda korpus luteum bulunan (CL+) ve vücut kondisyon skoru 2,75-3,75 olan inekler (Mishra ve ark. 2016) çalışmaya alındı. Buna karşın muayeneler sırasında genital organlarında sorun belirlenen hayvanlar çalışmaya dahil edilmedi.

Östrus Senkronizasyonu ve Suni Tohumlamaların Yapılması

Ovaryumda korpus luteum belirlenmiş olan ineklere, progesteron+ovsynch östrus senkronizasyon protokolü uygulandı. Bu amaçla GnRH (10 µg, Buserelin, Receptal®, İntervet, Türkiye) kas içi enjeksiyonu ile birlikte progesteron kaynağı (1.38 g, CIDR 1380®, Zoetis, Türkiye) intravaginal olarak yerleştirildi (-10. gün). Yedi gün sonra progesteron kaynağı vaginadan çıkarıldı ve PGF_{2α} (25 mg, Dinoprost, Dinolytic®, Zoetis, Türkiye) kas içi enjeksiyonu yapıldı (-3. gün). PGF_{2α} enjeksiyonundan 48 saat sonra GnRH enjeksiyonu tekrar uygulandı (-1. gün). İkinci GnRH enjeksiyonundan 12-16 saat sonra fertilitesi bilinen boğa spermaları ile sabit zamanlı tohumlamalar yapıldı (0. gün).

Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Tohumlamaları yapılan inekler rastgele 2 gruba ayrıldı. -Birinci Grup (Karprofen grubu, n=100): Bu gruba dahil edilen ineklere tohumlama sonrası 14. günün sabahı 1,4 mg/kg dozda karprofen (Rimadyl XL, Zoetis, Türkiye) deri altı enjeksiyonu uygulandı. -İkinci Grup (Kontrol grubu, n=100): Bu gruba dahil edilen ineklere tohumlama sonrası 14. günün sabahı karprofen ile aynı miktarda deri altı fizyolojik tuzlu enjeksiyonu yapıldı (Şekil 1).

Gebelik Muayenelerinin Yapılması

Gebelik muayenesi amacıyla tohumlama sonrası 30. günde real time ultrason (6 MHz linear prob, Falcovet, Pie Medical, Hollanda) ile inekler muayene edildi. Uterusta non-ekojen bir bölge içerisinde hiperekojen embriyonun görülmesi gebelik pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanıldı. Veri analizi yapılırken, iki grup karşılaştırması için Bağımsız 2 grup t testi (Student's t test), ön şartlar sağlanmadığında ise Mann Whitney-U

testi, üç ve daha fazla grup karşılaştırması için Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanıldı. Testlerin anlamlılık düzeyi için $p < 0,05$ değeri kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen tüm ineklerin uygulama başlangıcındaki ortalama yaşı (ay), süt verimi (kg) ve sağımda geçen gün süreleri (gün) sırasıyla $55,71 \pm 21,1$; $22,56 \pm 7,75$ ve $243,53 \pm 129,1$ olarak belirlendi (Tablo 1). Bununla birlikte çalışmada karprofen grubundan 3 ve kontrol grubundan ise 5 inek olmak üzere toplam 8 inek gebelik muayenesinden önce çeşitli nedenlerle (mastitis, ayak hastalıkları vb.) sürüden çıkarıldığı için istatistiksel değerlendirmeye dahil edilmedi. Buna göre tohumlama sonrası 30. günde ultrasonografi ile yapılan muayenede, gebe kalma oranları karprofen grubunda %42,26, kontrol grubunda ise %25,26 olarak belirlendi ($p < 0,05$, Tablo 2).

İneklerin süt verimlerine göre gebe kalma oranları Tablo 3'de verildi. İnekler süt verimlerine göre < 20 , $20-30$ ve > 30 kg olarak 3 alt gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki ineklerin gebelik oranlarının, süt verimi arttıkça düştüğü tespit edildi. Karprofen grubunda ise süt verimi < 20 kg ile, $20-30$ kg olan ineklerde gebelik oranı > 30 kg'a göre daha yüksek belirlendi. Bununla birlikte 3 farklı süt veriminde de karprofen yapılan ineklerde gebe kalma oranı kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu.

Doğumdan sonra uzun süre gebe kalmamış olan ineklerin sağımda geçen gün sürelerine göre gebelik oranları Tablo 4'te sunuldu. Her iki grupta da sağımda geçen gün süresinin gebe kalma oranını etkilemediği ancak karprofen uygulanan grupta gebe kalma oranlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan ineklerin ortalama yaşı, süt verimi ve sağımda geçen gün süreleri
Table 1. Mean age, milk yield and days in milk of cows used in the study

Grup	Yaş (ay)	Süt Verimi (kg)	Sağımda geçen gün süresi (gün)
Karprofen	$56,29 \pm 20,1$	$22,28 \pm 7,88$	$247,90 \pm 141,6$
Kontrol	$55,13 \pm 22,2$	$22,83 \pm 7,65$	$239,06 \pm 115,5$
Toplam	$55,71 \pm 21,1$	$22,56 \pm 7,75$	$243,53 \pm 129,1$

Tablo 2. Tohumlama sonrası 30.günde yapılan ultrasonografik muayenede elde edilen gebelik bulguları
Table 2. Pregnancy findings obtained in the ultrasonographic examination on the 30th day after insemination

Grup	Gebe	Gebe değil	Toplam	Gebelik oranı (%)	P
Karprofen	41	56	97	42,26	$< 0,05$
Kontrol	24	71	95	25,26	

Tablo 3. Süt verimlerine göre ineklerin gebelik oranları
Table 3. Pregnancy rates of cows according to milk yields

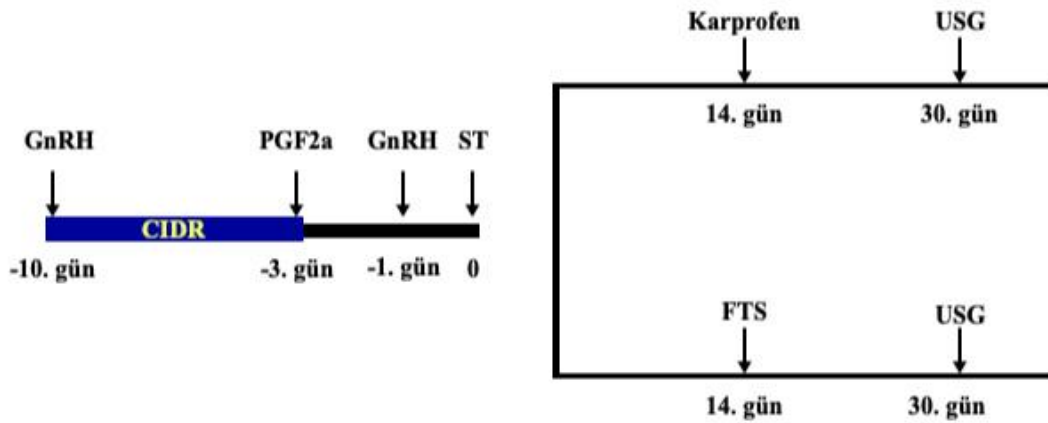
Süt verimi (kg)	Karprofen grubu	Kontrol grubu
≤20	%47,05 (16/34) ^{aA}	%33,33 (11/33) ^{aA}
20-30	%42,85 (21/49) ^{aA}	%25,58 (11/43) ^{Ab}
≥30	%28,57 (4/14) ^{bA}	%10,52 (2/19) ^{bA}

a-b: Sütunlar içerisindeki fark; A-B: Satırlar arasındaki fark

Tablo 4. Sağımda geçen gün sürelerine göre ineklerin gebelik oranları
Table 4. Pregnancy rates of cows according to the days in milk

Sağımda geçen gün süresi (gün)	Karprofen grubu	Kontrol grubu
≤240	%42,85 (24/56) ^{aA}	%25 (14/56) ^{Ab}
>240	%41,46 (17/41) ^{aA}	%25,64 (10/39) ^{Ab}

a-b: Sütunlar içerisindeki fark; A-B: Satırlar arasındaki fark



Şekil 1: Çalışmada uygulanan senkronizasyon protokolü
Figure 1: Synchronization protocol applied in the study

TARTIŞMA

Erken embriyonik ölümlerin sütçü sığır işletmelerinde en önemli sorunlardan biri olduğu bildirilmektedir (Diskin ve ark. 2012, Diskin ve ark. 2016). Yapılan çalışmalarda düvelerde ve orta verimli ineklerde fertilizasyon oranı %90-100 iken, yüksek verimli ineklerde bu oranın %85-95 arasında değiştiği bildirilmektedir. Fertilizasyon oranı bu derece yüksek olmasına rağmen buzağılama oranı %55 düzeyinde gerçekleşmektedir. Fertilizasyon-doğum arasındaki kayıpların yaklaşık %40'ının erken/geç embriyonik ölümlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (Thatcher ve ark. 1994, Walsh ve ark. 2011, Diskin ve ark. 2016). Bu kayıpların da büyük bir kısmının gebeliğin maternal kabulünden önce şekillendiği bildirilmektedir (Santos ve ark. 2004, Morris ve Diskin 2008, Wiltbank ve ark. 2016).

Erken gebelik döneminde maternal kabulün gerçekleşebilmesi için embriyo ve anne arasında önemli bir etkileşim söz konusudur. Bu süre zarfında anne ve embriyo arasında senkronizasyon farklılıkları meydana geldiğinde embriyonik kayıplar şekillenmektedir. Diğer bir ifadeyle embriyonun gelişim dönemi ve annenin siklusu (maternal ortam) arasında 12-24 saatten fazla bir fark oluştuğunda embriyonik ölümler gelişebilmektedir (Lonergan ve Forde 2014). Çünkü maternal ortam ile embriyo arasındaki asenkroni embriyonun gelişimini zayıflatmaktadır. Zayıf gelişen embriyolar az veya belirlenemeyecek miktarlarda IFN- τ üretmekte ve sonuçta maternal kabul döneminde PGF_{2 α} salınımını engelleyememektedir. Çünkü IFN- τ 'nın temel olarak görevi endometriyumdan pulzatil PGF_{2 α} salınımını durdurarak korpus luteumun regresyonunu engellemektir. IFN- τ , bu etkisini endometriyumdaki östrojen reseptör- α ve oksitosin reseptörlerini baskılayarak gerçekleştirmektedir (Vural ve ark. 2012). Bu nedenle zayıf gelişen embriyoların yeterince IFN- τ salgılayamaması nedeniyle embriyonik ölümler kaçınılmaz olmaktadır (Mann ve Lamming 1999, Thatcher ve ark. 1997, Thatcher ve ark. 2006, Erdem ve Güzeloğlu 2010, Alkan ve Erdem 2018). Bu kayıpları azaltmak ve fertilitenin artırılması amacıyla son yıllarda tohumlamadan sonra farklı günlerde nonsteroid antiinflatuvar ilaçların uygulanabileceği bildirilmektedir (Binelli ve ark. 2001, Thatcher ve ark. 1997, Güzeloğlu ve ark. 2007, Erdem ve Güzeloğlu 2010, Dursun 2011, Alkan ve Erdem 2018). Sunulan çalışmada da COX-2 inhibitörü olan karprofen uygulamasıyla, maternal kabul döneminde PGF_{2 α} salınımı baskılanarak korpus luteumun ömrünün uzatılması ve zayıf gelişen embriyoya yeterli IFN- τ üretmesi için zaman kazandırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tohumlama sonrası 14. günde karprofen uygulamasının, gebe kalma oranını kontrol grubuna göre %17 artırdığı tespit edilmiştir. Gebe kalma oranında elde edilen bu olumlu etkiye bağlı olarak tohumlama sonrası 14. günde karprofen uygulamasının fertilitenin artırılmasına yönelik yeni bir strateji olarak

değerlendirilebileceği düşünülmüştür. Ayrıca karprofenin sütte kalıntı bırakmaması, bilinen yan etkisinin olmaması ve tek enjeksiyonun yeterli olması diğer nonsteroid antiinflatuvar ilaçlara göre avantaj sağlamaktadır (CVMP 2004, von Krueger ve Heuwieser 2010).

Fertilitenin artırılması amacıyla suni tohumlama sonrası nonsteroid antiinflatuvar ilaçların uygulandığı birçok çalışmada gebe kalma oranlarında farklı sonuçlar elde edilmiştir (Güzeloğlu ve ark. 2007, Erdem ve Güzeloğlu 2010, von Krueger ve Heuwieser 2010, Emre ve ark. 2012). Bu farklılıkların oluşmasında hayvan materyali (inek, düve), kullanılan nonsteroid antiinflatuvar ilaç (flunüksin meglumin, karprofen, meloksikam), uygulama yolu, günü ve süresi gibi birçok faktör etkili olmaktadır (Alkan ve Erdem 2018).

Güzeloğlu ve ark. (2007), Holstein düvelerde yaptıkları çalışmada suni tohumlama sonrası 15 ve 16. günlerde flunüksin meglumin uygulamasının gebe kalma oranını artırdığını bildirmişlerdir. Gebe kalma oranlarındaki artışın; uygulanan flunüksin megluminin, lutealizisi geciktirerek muhtemelen zayıf olarak gelişen embriyoların hayatta kalma şansını artırmasından kaynaklandığını ifade etmektedirler. Nitekim yapılan bir çalışmada (Odensvik ve ark. 1998) östrus siklusunda oral olarak uygulanan flunüksin megluminin uterusu PGF_{2 α} sentezini ve salınımını engellediği tespit edilmiştir. Bu sayede korpus luteumun ömrünün ve siklusun 5-6 gün uzadığı, progesteron seviyesinin flunüksin uygulamasından etkilenmediği ve luteal fazın uzamasına bağlı olarak progesteron miktarının arttığı tespit edilmiştir. Amiridis ve ark. (2009) ise Holstein düvelere östrus siklusunun 16, 17 ve 18. günlerinde uygulanan meloksikamın östrus siklusunun süresini kontrol grubuna göre uzattığını belirlemişlerdir. Bu uzamanın nedeninin prostaglandin salınımının inhibe edilmesinden veya zayıf gelişen embriyonun yaşam süresinin uzatılmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Amiridis ve ark. 2009).

Emre ve ark. (2012), sütçü ineklerde suni tohumlama sonrası 13 ve 14. günlerde 12 saat arayla uygulanan flunüksin meglumin kontrol grubuna göre gebe kalma oranlarını artırdığını ancak bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Repeat breeder düvelerde yapılan bir çalışmada ise tohumlama sonrası 15-16. günlerde uygulanan flunüksin megluminin gebe kalma oranını (flunüksin meglumin grubu %50 ve kontrol grubu %20, p>0,05) artırmada etkili olabileceği belirlenmiştir (Doğruer ve ark. 2007). Amiridis ve ark. (2009) da repeat breeder ineklerde suni tohumlama sonrası 16 ve 18. günlerde meloksikam uygulamasının gebe kalma oranını artırdığı bildirmişlerdir.

Suni tohumlama sonrası uygulanan nonsteroid antiinflatuvar ilaçların gebe kalma oranını artırdığını bildiren çalışmalar olduğu gibi herhangi bir etkisinin olmadığını veya olumsuz etki oluşturduğunu bildiren araştırmalar da mevcuttur (Dursun 2011, Lucacin ve ark. 2018, von Krueger ve Heuwieser 2010). Dursun

(2011) suni tohumlama sonrası uygulanan fluniksin meglumin ve ketoprofenin; von Krueger ve Heuwieser (2010) fluniksin meglumin ve karprofenin; Lucacin ve ark. (2018) ise fluniksin megluminin gebe kalma oranı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

Erdem ve Güzelöglü (2010), Holstein ırkı düvelere suni tohumlama sonrası 15. günde yapılan meloksikamın gebe kalma oranını (meloksikam grubu %24,3, kontrol grubu %52, $p < 0,05$) düşürdüğünü bildirmişlerdir. Bu sonuçlar doğrultusunda meloksikamın sığırlarda gebelik esnasında kullanılmasının güvenli olduğu düşünülmektedir. Çünkü gebeliğin maternal kabulü sürecinde zararlı olabileceği vurgulanmıştır. Bu zararlı etkinin nedeninin, meloksikamın yarılanma ömrünün oldukça uzun olmasından dolayı prostaglandin aktivitesini olumsuz etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Çünkü prostaglandinlerin periimplantasyon aşamasında da görev aldığı bilinmektedir. Uzun etkili bir nonsteroid antiinflamatuar ilacın maternal kabul ve implantasyon sürecinde kullanılmasının gebe kalma oranını düşürebileceği vurgulanmıştır (Weems ve ark. 2006, Erdem ve Güzelöglü 2010, Spencer ve ark. 2013). Bununla birlikte fertilitenin artırılması amacıyla tohumlama sonrası yapılacak bütün destek uygulamalarında uterusu sağlıklı bir embriyonun bulunması gerekmektedir. Çünkü sığırlarda farklı nedenlere bağlı olarak çok erken dönemde de (0-7. günler) embriyonik ölümler meydana gelebilmektedir (İnskeep ve Dailey 2005). Bu sorunun ortaya çıkmasında oosit kalitesi ve folikül gelişimi oldukça önemli bir yere sahiptir (Morris ve Diskin 2008). Çünkü oosit kalitesi başarılı bir fertilizasyon sonrası, blastosist gelişim dönemi ve maternal kabul dönemi üzerine direkt etkiye sahiptir (Watson 2007). Sunulan çalışmada da olduğu gibi tohumlama sonrası karprofen uygulamasının başarısı, uterusu embriyo varlığında etkili olabilecek bir yöntemdir. Dolayısıyla doğumdan sonra uzun süre gebe kalmayan ineklerde gebelik oranında elde edilen %17 artış, bu hayvanlarda destek sağlanabilecek bir embriyo varlığına işaret etmektedir. İneklerde fertilité ve süt verimi arasında yakın bir ilişki olduğu ve yüksek süt verimli ineklerde döl veriminin azaldığı bildirilmektedir (Nebel ve McGillard 1993, LeBlanc 2013, Bedere ve ark. 2018). Çünkü süt verimi arttıkça karaciğer klirensi yükselmekte ve steroid metabolizması hızlanmaktadır. Bunun sonucu olarak steroid hormon (progesteron ve östrojen) seviyeleri düşmektedir. Sonuç olarak da gebelik oranı gibi birçok reproduktif parametre olumsuz etkilenmektedir (Wathes ve Taylor 2002, Walsh ve ark. 2011, LeBlanc 2013, Berry ve ark. 2016). Alkan ve Erdem (2020) ve Mellado ve ark. (2012) repeat breeder sütçü ineklerde, Buckley ve ark. (2003), Gabor ve ark. (2008) ve Hagiya ve ark. (2013) sütçü ineklerde, süt verimi arttıkça gebe kalma oranının düştüğünü tespit etmişlerdir. Vasconcelos ve ark. (2006) ise yüksek süt verimli ineklerde gebelik oranının daha düşük olduğunu ve embriyonik ölüm oranının daha yüksek olduğunu

bildirmişlerdir. Yapılan bir meta analiz çalışmasında ise süt veriminin fertilité ile yakından ilişkili olduğu ve süt miktarının artmasının embriyonik kayıplara neden olduğu tespit edilmiştir (Bedere ve ark. 2018). Sunulan çalışmada da kontrol grubunda süt verimi yüksek olan ineklerde (≥ 30 kg) gebelik oranı diğer ineklere göre daha düşük bulunmuştur. Ancak süt verimi yüksek olan ineklere karprofen uygulamasının kontrol grubuna göre gebe kalma oranını artırabileceği tespit edilmiştir. Bu artışın nedeninin yüksek süt verimli ineklerde embriyonik ölümlerin azaltılmasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Çünkü yüksek süt verimli ineklerde progesteron yetersizliğine bağlı olarak embriyonun gelişimi sektete uğramaktadır. Bunun sonucunda ise embriyo luteolizisi engellemek için yeterli miktarda IFN- τ salgılayamamakta ve embriyonik ölümler kaçınılmaz olmaktadır (Mann ve Lamming 1999, Walsh ve ark. 2011, Diskin ve ark. 2016). Ancak yapılan karprofen uygulamasının luteolizisi engelleyerek yavaş gelişen ve yeterli IFN- τ salgılayamayan embriyoya zaman kazandırarak gelişimine devam etmesini sağladığı düşünülmektedir. Bu sayede doğumdan sonra uzun süre gebe kalmamış ve yüksek süt verimli ineklerde karprofen uygulamasının gebe kalma oranını arttırmada etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

Sütçü sığır işletmelerinde, ineklerin doğumdan sonra gebe kalmadan geçirdikleri süre (açık gün) karlı bir yönetim için oldukça önemli bir kriterdir (De Vries 2006). İşletmeden işletmeye farklılık göstermekle birlikte ineklerin istenilen sınırlar içerisinde (postpartum < 120 gün) gebe kalamaması ciddi ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Bu nedenle ineklerin doğumdan kısa bir süre sonra yeniden gebe kalması istenilmektedir (Ferguson ve Skidmore 2013). Ancak sunulan bu çalışmada materyal olarak kullanılan ineklerin gebe kalmadan geçirdikleri süre (ortalama $243,53 \pm 129,1$ gün) oldukça uzundur. Ayrıca bu çalışmada ineklerin gebelik oranları ortalama sağımda geçen gün sürelerine (≤ 240 ve > 240 gün) göre değerlendirilmiştir. Her iki grupta da sağımda geçen gün süresinin gebe kalma oranını etkilemediği tespit edilmiştir. Özellikle sağımda geçen gün süresinin uzamasına neden olan repeat breeder ineklerde yapılan çalışmalarda da sağımda geçen gün süresinin gebelik oranını etkilemediği tespit edilmiştir (Villaruel ve ark. 2004, Shams-Esfandabadi ve Shirazi 2006, Shams-Esfandabadi ve ark. 2007, Alkan ve Erdem 2020). Bununla birlikte Fischer-Tenhagen ve ark. (2010) ve Mellado ve ark. (2012) ise gebe kalma oranının, ineklerin sağımda geçen gün süreleri arttığında düştüğünü bildirmişlerdir.

SONUÇ

Sonuç olarak doğumdan sonra uzun süre gebe kalmamış olan ineklere, tohumlama sonrası 14. günde

karprofen uygulamasının gebe kalma oranını artırmada etkili olabileceği kanısına varıldı. Bununla birlikte süt veriminin gebelik oranını etkilediği ve yüksek süt verimli ineklere karprofen uygulamasının gebe kalma oranını artırabileceği tespit edildi. Ancak sağımda geçen gün süresinin gebe kalma oranını etkilemedi belirlendi.

Proje Destek Bilgileri: Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19401008 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'nun onayı (2018/181) ve izniyle yürütüldü.

Teşekkür: Bu çalışmada istatistiksel analizlerin yapılmasına yardımcı olan Doç. Dr. M. Ağah TEKİNDAL'a teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

Alkan H, Erdem H. Repeat breeder ineklerde tohumlama sonrası yapılan hormonal desteğe, laktasyon sayısı, süt verimi ve sağımda geçen gün süresinin etkisi. *Eurasian J Vet Sci.* 2020; 36(4): 298-305.

Alkan H, Erdem H. İneklerde nonsteroid antiinflatuar ilaçların reproduktif amaçlı kullanımı. *Ataturk Univ Vet Bil Derg.* 2018; 13(1): 112-120.

Amiridis GS, Tsiligianni T, Dovolou E, Rekkas C, Vouzaras D, Menegatos I. Combined administration of gonadotropin-releasing hormone, progesterone, and meloxicam is an effective treatment for the repeat-breeder cow. *Theriogenology.* 2009; 72(4): 542-548.

Bartlett PC, Kirk JH, Mather EC. Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology.* 1986; 26(3): 309-322.

Bedere N, Cutullic E, Delaby L, Garcia-Launay F, Disenhaus C. Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows. *Livest Sci.* 2018; 210: 73-84.

Berry DP, Friggens NC, Lucy M, Roche JR. Milk production and fertility in cattle. *Annu Rev Anim Biosci.* 2016; 4: 269-290.

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology.* 2001; 56(9): 1451-1463.

Buckley F, O'sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calving Holstein-Friesians. *J Dairy Sci.* 2003; 86(7): 2308-2319.

CVMP. Committee for veterinary medicinal products: Carprofen (Extension to dairy cattle) summary report (3). EMEA/MRL/914/04-FINAL. Retrieved from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/carprofen-summary-report-3-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf Accessed date: 29.12.2020.

De Vries A. Determinants of the cost of days open in dairy cattle. In proceedings of the 11th international symposium on veterinary epidemiology and economics. 2006; pp. 19-20.

Diskin MG, Parr MH, Morris DG. Embryo death in cattle: an update. *Reprod Fertil Dev.* 2012; 24(1): 244-251.

Diskin MG, Waters SM, Parr MH, Kenny DA. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 28(2): 83-93.

Dochi O, Takahashi K, Hirai T, Hayakawa H, Tanisawa M, Yamamoto Y, Koyama H. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology.* 2008; 69 (1):124-128.

Doğruer G, Sarıbay MK, Karaca F. Repeat breeder sorunlu düvelerde flunixin meglumin uygulamalarının gebelik oranı üzerine etkisi. *Fırat Univ Sağlık Bilim Derg.* 2007; 21(6): 263-268.

Dursun Ş. Laktasyonda olmayan İsviçre Esmeri İnek ve düvelerde ketoprofen ve flunixin meglumin uygulamasının gebe kalma oranı üzerine etki. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya, 2011.

Emre B, Zonturlu AK, Korkmaz Ö. Sütçü ineklerde ovsynch protokolünü takiben uygulanan flunixin meglumin'in gebelik oranı üzerine etkisi. *Harran Üniv Vet Fak Derg.* 2012; 1(2): 88-91.

Erdem H, Güzeloğlu A. Effect of meloxicam treatment during early pregnancy in holstein heifers. *Reprod Dom Anim.* 2010; 45: 625-628.

Ferguson JD, Skidmore A. Reproductive performance in a select sample of dairy herds. *J Dairy Sci.* 2013; 96(2): 1269-1289.

Fischer-Tenhagen C, Thiele G, Heuwieser W, Tenhagen BA. Efficacy of a treatment with hCG 4 days after AI to reduce pregnancy losses in lactating dairy cows after synchronized ovulation. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45(3): 468-472.

Gabor G, Tóth F., Ózsvári L, Abonyi-Tóth Z, Sasser RG. Factors influencing pregnancy rate and late embryonic loss in dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43(1): 53-58.

Güzeloğlu A, Erdem H, Sarıbay MK, Thatcher WW, Tekeli T. Effect of the administration of flunixin meglumine on pregnancy rates in Holstein heifers. *Vet Rec.* 2007; 160: 404-406.

Hagiya K, Terawaki Y, Yamazaki T, Nagamine Y, Itoh F, Yamaguchi S, Abe H, Gotoh Y, Kawahara T, Masuda Y, Suzuki M. Relationships between conception rate in Holstein heifers and cows and milk yield at various stages of lactation. *Animal.* 2013; 7(9): 1423.

- Inskeep EK, Dailey RA.** Embryonic death in cattle. *Vet Clin Food Anim Prac.* 2005; 21(2): 437-461.
- LeBlanc SJ.** Is a high level of milk production compatible with good reproductive performance in dairy cows?. *Anim Front.* 2013; 3(4): 84-91.
- Lonergan P, Forde N.** Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal.* 2014; 8(s1): 64-69.
- Lucacin E, Pinto-Neto A, Mota M, Acco A, Souza M, Alberton J, Silva A.** Effects of flunixin meglumine on reproductive parameters in beef cattle. *Anim Reprod.* 2018; 7(2): 75-79.
- Mann GE, Lamming GE.** The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reprod Dom.* 1999; 34: 269-274.
- Mellado M, Zuñiga A, Veliz FG, de Santiago A, Garcia JE, Mellado J.** Factors influencing pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder cows induced to ovulate with a CIDR-based protocol. *Anim Reprod Sci.* 2012; 134(3-4): 105-111.
- Mishra S, Kumari K, Dubey A.** Body condition scoring of dairy cattle: A review. *RRJVS,* 2016; 2, 58-65.
- Morris D, Diskin M.** Effect of progesterone on embryo survival. *Animal.* 2008; 2(8):1112-1119.
- Mortimer RG, Farin PW, Stevens RD.** Reproductive examination of the non-pregnant cow. In: *Current Therapy in Large Animal Theriogenology.* Ed; Youngquist RS, W.B Saunders Co., Philadelphia, USA. 1997; pp.268-275.
- Nebel RL, McGilliard ML.** Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 1993; 76(10): 3257-3268.
- Odensvik K, Gustafsson H, Kindahl H.** The effect on luteolysis by intensive oral administration of flunixin granules in heifers. *Anim Reprod Sci.* 1998; 50(1-2): 35-44.
- Perez-Marin CC, Moreno LM, Calero GV.** Clinical approach to the repeat breeder cow syndrome. In: *A bird's-eye view of veterinary medicine,* Ed; Perez-Marin CC, 1st Ed, Intech, Rijeka, Croatia. 2012; pp. 337-362.
- Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvao KN.** The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci.* 2004; 82: 513-535.
- Shams-Esfanabadi N, Shirazi A.** Effects of supplementation of repeat-breeder dairy cows with CIDR from 5-19 post-insemination on pregnancy rate. *Pakistan J Biol Sci,* 2006; 9(11): 2173-2176.
- Shams-Esfandabadi N, Shirazi A, Mirshokrai P, Bonyadian M.** Influence of hCG administration after AI on conception rates and serum progesterone concentration in cattle. *PJBS,* 2007; 10(16): 2709.
- Spencer TE, Forde N, Dorniak P, Hansen TR, Romero JJ, Lonergan P.** Conceptus-derived prostaglandins regulate gene expression in the endometrium prior to pregnancy recognition in ruminants. *Reproduction.* 2013; 146(4): 377-387.
- Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD, Coelho S.** Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. *Theriogenology,* 1997; 47(1): 131-140.
- Thatcher WW, Guzeloglu A, Bilby TR.** Early embryonic mortality in modern dairy cows: causes, consequences and remedies. *Vlaams Diergen Tijds.* 2006; 75: 106-113.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt EP.** Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J Anim Sci Technol.* 1994; 72: 16-30.
- Vasconcelos JLM, Demétrio DGB, Santos RM, Chiari JR, Rodrigues CA, Sa Filho OG.** Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology,* 2006; 65(1): 192-200.
- Villarroel A, Martino A, BonDurant RH, Dèletang F, Sischo WM.** Effect of post-insemination supplementation with PRID on pregnancy in repeat-breeder Holstein cows. *Theriogenology,* 2004; 61(7-8): 1513-1520.
- von Krueger X, Heuwieser W.** Effect of flunixin meglumine and carprofen on pregnancy rates in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2010; 93: 5140-5146.
- Vural MR, Güzeloğlu A, Küplülü Ş.** Gebelik fizyolojisi. In: *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji.* Eds: Semacan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A, 1st ed, Medipres, Malatya, Türkiye. 2012; pp. 125-156.
- Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO.** A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011; 123(3-4): 127-138.
- Wathes C, Taylor V.** Fertility in High Yielding Dairy Cows. *Holstein J.* 2002; 1: 108-118.
- Watson AJ.** Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *J Anim Sci.* 2007; 85(suppl_13): E1-E3.
- Weems CW, Weems YS, Randel RD.** Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Vet J,* 2006; 171(2): 206-228.
- Wiltbank MC, Baez GM, Garcia-Guerra A, Toledo MZ, Monteiro PL, Melo LF, Ochoa JC, Santos JEP, Sartori R.** Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology.* 2016; 86(1): 239-253.
- Young CD.** Reproductive efficiency following administration of an inhibitor of prostaglandin F2 α during early embryonic development in dairy cattle. Master thesis, The University of Tennessee, Knoxville, 2004.

Investigations on Veterinary Folklore in the Lower Euphrates Basin: Folk Beliefs and Practices Applied on Animals

Erhan YÜKSEL^{1*}, Rahşan ÖZEN²

¹Sivas Cumhuriyet University, Veterinary Faculty, Veteriner History and Deontology Department, 58140, Sivas, Turkey

²Firat University, Veterinary Faculty, Veteriner History and Deontology Department, 23119, Elazığ, Turkey

ABSTRACT

This study was aimed at the compilation and introduction to the scientific literature of the folk beliefs on animals in the lower Euphrates basin, a major settlement area of common history, which has been home to several civilizations, and thus, is an area of great significance for folklore. For this purpose, in total 78 persons, residing in the lower Euphrates basin in the Adıyaman, Elazığ, Malatya and Şanlıurfa provinces and the Nizip district of Gaziantep province were interviewed in person. The findings obtained were assessed using the “content analysis” method. The study revealed that, in the lower Euphrates basin, some animals are considered to bring good luck; some animals are considered to bring bad luck. On the other hand, the findings obtained demonstrated that the dog, owl, and fox are considered to bring good luck and to bring bad luck. Furthermore, it was determined that the placenta of newly parturited animals is either hung on the branch of a fig tree or thrown into the river, in the belief that this would increase the milk yield of lactating animals, and it was settled that “pox bowl” is used against smallpox, mole is used against “mole head” disease, and it was ascertained that the skull of horses, cattle, sheep and goats as well as tortoise shells are hung on the walls of houses and stables, in the belief that this would protect the people and animals from the evil eye. In conclusion, rich folkloric elements related to folk beliefs on animals were observed in the lower Euphrates basin and the beliefs of this region were found to be similar to those maintained in the different regions of Anatolia.

Keywords: Lower Euphrates Basin, beliefs, veterinary folklore

Aşağı Fırat Havzasında Veteriner Hekimliği Folkloru Üzerine Araştırmalar: Hayvanlar ile İlgili İnanışlar ve Uygulamalar

ÖZ

Sonraki nesillere aktarılan değerler olan halk inanışları içerisinde, insanoğlunun hayatında ayrılmaz bir parça olan hayvanlar önemli yer tutmakta, aynı zamanda bu inanışlar veteriner hekimliği folklorunun da önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Bu araştırmada, bilinen tarihin önemli yerleşim merkezlerinin başında gelen ve halk bilimi açısından büyük önem taşıyan Aşağı Fırat Havzasında, hayvanlar ile ilgili inanışların derlenerek literatüre kazandırılması amaçlandı. Bu amaçla Aşağı Fırat Havzasında yer alan Adıyaman, Elazığ, Malatya, Şanlıurfa illeri ile Gaziantep’in Nizip ilçesinde toplam 78 kişiyle yüz yüze görüşme yapıldı. Elde edilen bulgular “içerik analizi” yöntemiyle değerlendirildi. Çalışmada, Aşağı Fırat Havzasında horoz, güvercin, koyun, leylek ve kır atın uğurlu; keçi, kedi, alaca sığır, siyah katır, eşek ve tavşanın uğursuz; köpek, baykuş ve tilkinin de uğurlu veya uğursuz hayvanlar olarak kabul edildiği saptandı. Ayrıca, yeni doğum yapan hayvanların eşinin (plasenta), hayvanın sütünün bol olacağı inancıyla incir ağacına asıldığı veya aynı beklentiyle akarsuya atıldığı; çiçek hastalığına karşı “çiçek tası” kullanıldığı, “kösni başı” hastalığında köstebek kullanıldığı; nazardan korunmak için ev ve ahırlara, at, büyükbaş ve küçükbaş hayvanların kafatası ile kaplumbağa kabuğunun asıldığı şekilde bulgulara ulaşıldı. Sonuç olarak, Aşağı Fırat Havzasında, hayvanlarla ilgili inanışlar açısından zengin folklorik uygulamalara rastlandığı ve yörede saptanan inanışların birçoğunun Anadolu’nun farklı bölgelerindekilere benzer olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Aşağı Fırat Havzası, inanışlar, veteriner hekimliği folkloru

To cite this article: Yüksel E. Özen R. Investigations on Veterinary Folklore in the Lower Euphrates Basin: Folk Beliefs and Practices Applied on Animals. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):91-100

Submission: 16.12.2020 Accepted: 14.02.2021 Published Online: 24.02.2021

ORCID ID; EY: 0000-0002-0735-0375 RÖ: 0000-0001-5788-0289

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

Folklor, halkın geleneğe bağlı maddi ve manevi kültürünü kendine özgü metotlarla derleyen, araştıran, sınıflandıran, çözümleyen ve halk kültürü üzerine değerlendirmeler yapan bir bilimdir (Ülkütaşır 1972, Ekici 2000, Dundes 2005, Tan 2008). Veteriner hekimliği mesleğinin var olan kendine has gelenek ve görenekleri, çeşitli inançlarına "*veteriner hekimliği folkloru*" adı verilmektedir (Salman 1948, Dinçer 1967, Dinçer 1980, Doğanay 1982, Boratav 1994). Veteriner hekimliği folklorunun bir parçası olan halk inanışları ait oldukları toplumun kimliğini ve karakteristik özelliğini yansıtmaları nedeniyle Türk halk bilgisi açısından önem taşımaktadır (Dinçer 1967, Dinçer 1976, Dinçer 1980, Doğanay 1982, Artun 1998, Yerlikaya 2002, Özen 2006, Çetin 2007, Sinmez 2011, Özen and Yüksel 2014, Küçükaslan and Uçar 2016, Sinmez and Aslım 2017).

Bilinen tarihi devirlerde Anadolu'ya hâkim olan güçlerin öncelikli yerleşim merkezlerinin başında Fırat Havzası (FH) gelmekte (Yuvalı 1992), adını Fırat Nehrinden alan bu coğrafi alan, saha ve mekân bakımından Yukarı, Orta ve Aşağı Fırat Havzası olarak üç bölüme ayrılmaktadır. FH tarihi öneme sahip bir bölge olarak tanımlanmakta, bu özelliği nedeniyle de halk bilimi açısından önemsenmektedir (Buran 1992, Karaboran 1992, Yuvalı 1992). Ancak, bölgenin tarihi önemine karşın Doğu Anadolu ve FH folkloru üzerine yapılan araştırmalar sınırlı düzeyde kalmıştır (Toygar 1992). Benzer şekilde, FH kapsamında veteriner hekimliği ve hayvancılık özelinde yapılan folklorik araştırmaların (Dinçer 1976, Kutlu 1987, Yerlikaya 2002) sayı ve kapsam açısından yetersizliği, yeni planlanması ve gerçekleştirilmesi gereken araştırmalar için gerekçe olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu araştırmada Aşağı Fırat Havzası (AFH) folklorunda, hayvanlarla ilgili sözlü bilginin toplanarak literatüre kazandırılması ve bu bilginin tarih boyunca AFH'de yaşamış toplumlarla olan bağlarının saptanması amaçlandı.

MATERYAL ve YÖNTEM

Çalışmada AFH'de yer alan Adıyaman, Elazığ, Malatya ve Şanlıurfa illeri ile Gaziantep'in Nizip ilçesinde yoğun hayvancılık faaliyetlerinin yürütüldüğü ilçe ve köylerde 22 Ekim 2010-29 Aralık 2010 tarihleri arasında 78 kaynak kişi ile yüz yüze görüşme yapıldı. Kaynak kişilerle yapılan yüz yüze görüşmeler esnasında kaynak kişi için bir numara verildi. Elde edilen verilere atfen, kaynak kişilerin gösteriminde kullanılan bu kod numaraları, bulgular bölümünde her bir inanışın sonunda üst simge olarak gösterildi. Elde edilen bulgular içerik analizi yöntemiyle değerlendirildi.

Uğurlu ve Uğursuzluk ile İlgili İnanışlar

Bir evin çatısına baykuşun konması uğursuzluk olarak kabul edilir^{1-3, 5, 15-18, 26, 34-38, 42, 43, 46-48, 55-61, 65, 69-71, 78}. Baykuş genelde viranelere konduğundan tepesine konduğu yuvanın yıkılacağı^{35-38, 42, 43, 60, 61, 69, 70} veya bir felâkete uğrayacağı düşünülür^{1, 5, 15-18, 26, 34-38, 42, 43, 55, 71, 78}. Evin çatısında öten baykuşun ise evin fertlerinden birinin öleceğine işaret ettiği kabul edilir^{15-18, 34, 42, 43, 46-48, 60, 61, 65, 69-71, 78}. Bu nedenle evlere doğru gelen baykuş korkutularak uzaklaştırılır. Baykuşun getireceği felâketten korunmak için bulgur, mercimek, un ve buğdayın pişirilmesi ile hazırlanan karışım evin etrafına bırakılır^{69, 70, 78}. Baykuşun felaket getirdiği inancından dolayı "*evinde baykuş okusun*" şeklinde bir beddua da bulunmaktadır¹⁵⁻¹⁸. Adıyaman ve Şanlıurfa'daki bazı kaynak kişilere göre ise evin çatısına baykuşun konması uğurlu görülür^{2, 3, 65, 71}. Çatıya konduğu zaman baykuşun Allah'a dua edeceği ve çatısına konduğu eve bereket getireceğine^{2, 3} ve baykuşun müjdecisi olduğuna inanılır^{65, 71}.

Sabah ezanında köpeklerin uluması uğursuzluk olarak kabul edilir^{1-3, 12-14, 35-38, 42-48, 52, 56-61, 71-75}. Ezan sırasında köpeklerin uzun uzun uluması (havlaması) köpeğin Azrail'i görebildiği^{1-3, 12-14, 35-38, 44, 45, 56-59} ve birinin öleceği inancı ile açıklanır^{1-3, 12-14, 35-38, 42-48, 52, 56-59, 73-75}. Köpekler uluduğunda köpekler "*başından bul*" diye bağırılır^{42, 43}. Köpekler hangi evin önünde ulursa o eve Azrail'in gelmesinin yakın olduğuna inanılır^{12-14, 73-75}. Böyle durumlarda köpeğe "*evin başını yiyecek*" denir¹²⁻¹⁴. Sabah ezan saatinde şeytanın köpeklerin içerisine girdiği ve bu yüzden köpeklerin sabah ezanında havladıklarına inanılır⁷¹. Öte yandan Adıyaman ve Malatya'da sabah ezanında köpeklerin ulumasının uğurlu kabul edildiği köyler de bulunmaktadır^{5-8, 10, 11, 15-18, 46-48}. Ezan sırasında köpeklerin uzun uzun uluması "*köpekler sabah ezanında yeryüzüne inen melekleri görür o yüzden havlar*"^{5-8, 10, 11, 46-48} veya "*köpekler sabah ezanında Allah'ı niyaz eder*" şeklinde açıklanır¹⁵⁻¹⁸. Evin bahçesinde köpek beslemek uğursuz kabul edilir^{51, 62}. Çünkü köpeklerin içerisine üç harfliler (cin) girer⁵¹. Köpekler necis kabul edilir ve eve sokulmaz^{32, 33, 62}. Bu inanış özellikle şafî mezhebinde olanlar için geçerlidir⁶². Bu nedenle, kedi-köpeğin girdiği yerde/evde namaz kılınmaz^{32-38, 62}.

Arabanın veya insanın önünden tavşan geçerse uğursuzluk olacağına inanılır^{5, 44, 45, 51}.

Leylek görülmesi uğurlu sayılır. Leyleği uçarken gören kişinin yolculuk yapacağına inanılır^{12-18, 46-48}.

Eşeklerin evin önünde veya ahırda çok anırmasının (bağırmasının) felaket habercisi olduğuna inanılır. Hayvanlar anırdığında "*bu eşek çok zırlıyor, kesin başımıza bir şey gelecek*" diye düşünülür⁶⁴.

Arabanın veya insanın önünden tilki geçmesi uğurlu sayılan bir durumdur^{5, 12-14, 42-45, 51}.

Gece vakti kedilerin ses çıkarmaları uğursuzluk olarak kabul edilir^{46-48, 50}. Siyah kedi görmek uğursuzluk sayılır^{42, 43, 56-61}.

Şavak Aşireti mensupları koyunlarına Çarşamba günleri tuz vermezler ve bugünü uğursuz kabul ederler. Eğer tuz verilirse bütün hayvanların hasta olacağına inanırlar³²⁻³⁴.

Avcıların av yolunda tilki görmeleri uğurlu sayılır^{5, 44, 45, 60, 61}.

Koç katımının Pazar veya Perşembe günü yapılması uğurlu sayılır^{32, 33}.

Hayvanlar, insanlara gönderilmiş nimet, kısmet olarak kabul edilir ve hayvanlara iyi bakmak ibadet olarak görülür^{40, 41}.

Hayvanlar otlaklar veya yaylalarda ne zaman güzel yayılırsa yağış olduğu inancı bulunmaktadır. Bu nedenle hayvanların güzel yayılması yağış olacağına işaret olarak kabul edilir⁶⁻⁸.

Kurban kanının alına sürülmesinin uğur getireceğine inanılır^{31, 60, 61}.

Kuşların yuvasını bozanın yuvasının bozulacağına inanılır^{31, 34, 44-48}.

Ev halkından biri yolculuğa çıktığında eğer bir süre sonra evdeki horoz öterse yolculuğa çıkan kişinin yolunun açık olacağına inanılır⁷¹.

Koyun meleğe, keçi ise şeytana benzetilir^{26, 29, 30}.

Güvercinin mübarek hayvan olduğuna inanılır ve yakın olduğu ya da beslendiği eve bereket getireceğine inanılır^{24, 29, 56, 70, 74}.

Kır at uğurludur derler ve uğurlu kabul edilir³¹.

Alaca sığır uğursuz kabul edilir ve beslenmesi hoş karşılanmaz³¹.

Kara renkli erkek katırlar alınmaz, çünkü bunların “*buylu*” (asabi) olduğuna inanılır³¹.

Nazar ile İlgili İnanışlar

Nazara çok inanılır ve nazar “*göz değmesi*” olarak isimlendirilir^{1, 4, 5, 9, 40-43, 46-49, 52, 60, 61, 63, 65}. Hayvanları nazardan korumak için boyunlarına mavi nazar boncuğu^{1, 4, 5, 9, 40-43, 46-48, 52, 60, 61, 63} ile Kuran-ı Kerim’den ayetler ve dualar yazılı olan “*muska*”lar asılır^{1, 5, 9, 40, 41, 46-48, 52, 63}. Ayrıca kaplumbağa kabuğunun nazara karşı koruyucu olduğuna inanılır, hayvanların boyunlarına⁶⁵, ev ve ahır girişlerine kaplumbağa kabuğu asılır^{31, 34, 76-78}. Hayvanların boyunlarına asılan kaplumbağa kabuğu içerisine taş konur ve taşların çıkardığı seslerin hayvanları kötülük

ve hastalıklardan koruduğuna inanılır⁶⁵. Nazardan korunmak için ev ve ahırların girişlerine at kafası⁴⁹ ve at nalı^{26, 49} asılır. Nazara karşı kaplumbağa kabuğu, büyükbaş ya da küçükbaş hayvanların kafatasları ahır girişlerine asılır^{46-48, 51}. Ayrıca, nazardan korunmak için Kuran-ı Kerim’den İhlas Suresi üç kez okunarak hayvanın yüzüne doğru üflenir^{69, 70}.

Koç katımında koçlara nazar değmesin diye kına sürülür³¹⁻³³.

Hastalık ve Tedavi ile İlgili İnanış ve Uygulamalar

Koyunlarda çiçek hastalığında tedavide ve hastalıktan korunmada “*çiçek tası*” (Bkz Şekil 1) kullanılır^{23-25, 27-30}. Bakırdan yapılan ve kimilerinin üzerinde Kuran-ı Kerim’den ayetler bulunan²³⁻²⁵ çiçek tası Hicaz’dan (Suudi Arabistan) getirilir^{66- 68}. Çiçek tası içerisine su alınır ve hayvanlara tas içerisindeki su serpilir^{23, 27-30, 39}. Su serpilirken çadırın kapısının önünde durulur ve tastaki su dışarıya çıkarılan hayvanlara serpilir²³⁻²⁵. Bir başka uygulamada ise çiçek tası içerisine alınan herhangi bir ziyaretten (yatur) getirilen toprak ile karıştırılan su hayvanlara serpilir. Çiçek tası güneş görmemelidir. Çiçek tasıyla su serpilmesi ya gün (güneş) doğmadan önce ya da gün battıktan sonra yapılmalıdır. Hayvanlar siyah bir kıl çadırın altına toplanır ve burada tüfek sıkılıp ürkütülerek tedavi edilmeye çalışılır³⁵⁻³⁸.

Adıyaman’daki hasta hayvanlar Çoban Dede Köyündeki “*Çoban Dede*” adlı ziyarete götürülür ve hayvanların bu ziyarette şifa bulacağına inanılır. Çoban dedenin mezarından alınan toprak ahırın tavanına asılırsa, o ahıra artık kene ve hastalığın girmeyeceğine inanılır¹⁹⁻²² (Bkz Şekil 2).

İnsanlar, “*kösni*” (köstebek) öldürdüklerinde vücutlarında irinli yaralar oluşur. Bu yaralara “*kösni başı*” adı verilir. Hastalığın tedavisi için köstebek yakalanıp öldürülür. Derisi ve iç organları çıkarılan köstebek yara üzerine bağlanır ve yaranın iltihabını iyileştirir⁵⁶⁻⁵⁹.

Kurbağaya dokunulursa vücutta siğil çıkar^{12-14, 31, 50}.

Hayvanları hastalıklardan korumak için yaylanın gidebildiği kadar üst kısımlarına gidilmeye çalışılır ve zirveye yakın yerlerin hastalıktan korunmak için en ideal yerler olduğuna inanılır³¹.



Şekil 1. Çiçek tası
Figure 1. Pox bowl



Şekil 2. Adıyaman'daki “Çoban Dede” ziyareti
Figure 2. “Çoban Dede” holy visiting place in the Adıyaman-Turkey

Yer, Su, Ev ve Ağaç İyeleri ile İlgili İnanışlar

Yeni doğum yapan hayvanların eşi düştüğü zaman, düşen eş alınarak götürülüp bir akarsuya atılır. Bu uygulama ile doğum yapan hayvanın sütünün akarsu gibi bol olacağına inanılır^{53, 54, 56-61}. Düşen eş bir incir ağacının üzerine atıldığında da yeni doğan hayvanın incir gibi bol sütlü olacağı düşünülür^{2-8, 10, 15-18}.

Salgın hastalıklarda, ölen hayvanlardan birinin ayağı kesilerek bir ağaç dalına asılırsa, hastalık ve ölümün sürüden uzak olacağına inanılır⁷³⁻⁷⁵.

Herhangi bir evde süte katılacak maya yere dökülürse komşu evler o eve maya vermezler. Maya verirlerse başlarına bir uğursuzluk veya hayvanlarının başına hastalık geleceğini düşünürler^{32, 33}.

Dini İnanışlar

Bir mutfak kabına fare girerse mutfak kabı artık haram kabul edilir ve kullanılmaz^{24, 25, 31-34, 42, 43, 46-48, 69, 70, 76- 78}. Tekrar kullanılması için mutfak kabı ile bir çeşmeye gidilmesi, su doldurulurken İhlâs Suresinin üç kez okunması ve kabın içerisindeki suyun boşaltılması gereklidir. Farenin temas ettiği kabın tekrar kullanılabilmesi için yedi^{31-34, 46-48, 69, 70, 76-78} veya 40 kez^{15-18, 42-45, 69, 70} temiz su ile doldurulup boşaltılması gerekmektedir^{15-18, 31-34, 42-45, 46-48, 69-70, 76-78}.

Kuyulara fare düşerse o kuyudaki suyun tekrar kullanılabilmesi için köyün inanç sistemi açısından önde geleni (sofisi veya imamı) kuyudan 300 kez su çeker ve yere döker^{65, 73-75}. Daha sonra en son çektiği sudan bir tas içer ve “*ben içtim artık belaldir*” der⁶⁵. Eğer kuyuya düşen fare canlı ise kuyudan kova ile 150 kez su çekilir, yere dökülür ve kuyudan her kova su çeğişte Kelime-i Şahadet getirilir⁷³⁻⁷⁵.

Diğer İnanışlar

Büyükbaş hayvanlarda çiftleştirmeden sonra dişi hayvanın üzerine bir erkek binerse hayvanın yavrusunun erkek, eğer bir kadın binerse dişi olacağına inanılır¹⁵⁻¹⁸.

TARTIŞMA

Elde edilen bulgular ışığında AFH'de varlığını sürdürdüğü tespit edilen hayvanlar ile ilgili inanışların zengin bir içeriğe sahip olduğu söylenebilir.

Gerek ürünlerinden gerekse güçlerinden faydalanılan hayvanlar bu özelliklerinin yanı sıra manevi olarak da bazı özelliklere sahiptiler. Hayvanlar, insanların günlük hayatlarında yer aldıkları gibi, inanç sistemleri içinde de oldukça önemli görevler üstlenmektedirler. Kurt, boğa, koç, teke, kartal veya yırtıcı kuşlar gibi hayvanların totemizm döneminde Orta Asya kavimlerinin çoğunda kutsal saydıkları bildirilmektedir (İnan 2000). AFH'de ise köpek, baykuş ve tilkinin hem uğurlu hem uğursuz olarak kabul edildiği, horoz, güvercin, koyun, leylek ve kır atın uğurlu; keçi, kedi, alaca sığır, siyah katır, eşek ve tavşanın uğursuz kabul edildiği bulgularına ulaşıldı. Yolculuk esnasında tilkinin araç ve şahısların önünden geçmesinin uğurlu, tavşanın ise uğursuz olduğu bulguları önceki araştırmalarda bildirilmiştir (Roux 2005, Kalafat 2012, Özen and Yüksel 2014, Sinmez and Aslım 2017). Bununla birlikte literatürde tavşanla ilgili olarak yakutlarda kuraklığın habercisi olduğu (Roux 2005, Ergun 2011), Tatar Türklerinin ise tavşan yılında kıtlık olacağına inandıkları (Tavkul 2007, Ergun 2011); tilki ile ilgili olarak da Altaylar ve Yakutlarda ata simgesi olduğu, Eski Türklerde (Kırgızlar, Kazaklar ve Yakutlar) ve Moğollarda kutsal bir hayvan olarak kabul gördüğü (Ögel 1993, Araz 1995, Duvarcı 2005, Yıldız 2011), yine Bektaşilerin, tilkinin Hızır olabileceği inancı nedeniyle uğurlu bir hayvan olarak kabul ettikleri bildirilmektedir (Kılıç 2000, Mollaibrahimoğlu 2008). Buradan hareketle AFH'de varlığı tespit edilen tilki ve tavşan ile ilgili inanışların kökenlerinin Orta Asya'ya ve Bektaşi kültürüne dayandığı, tavşan ile ilgili olarak Kayseri (Özen and Yüksel 2014) ve Diyarbakır (Küçükaslan and Uçar 2016) özelinde elde edilen verilerin benzer olduğu

söylenbilir. Öte yandan baykuş, köpek ve tilki ile ilgili elde edilen sonuçlara göre, bu hayvanların hem uğurlu hem de uğursuz olarak kabul edilmesinin Anadolu'da yaşamış farklı kültürlerin izlerinin bir göstergesi olduğu ileri sürülebilir. “*Belli kimselerde bulunduğu inanılan; insanlara, özellikle çocuklara, evcil hayvanlara, eve, mala mülke, hatta cansız nesnelere de zarar veren, bakıştaki çarpıcı ve öldürücü güç*” (Anonim 1998) olarak tanımlanan nazar ile ilgili olarak Anadolu'da hastalıkların bir kısmının “*nazar değmesi*”nden ileri geldiği ve nazardan korunmak için mavi boncuk, muska, at ve eşek nalı, kaplumbağa kabuğu, köpek ve at kafası gibi nesnelere kullanıldığı bildirilmiştir (Dinçer 1967, Araz 1991, Arslan 1998, Yerlikaya 2002, Kurum 2008, Mollaibrahimoğlu 2008, Sinmez 2011, Özen ve Yüksel 2014, Küçükaslan and Uçar, 2016, Sinmez and Aslım 2017). AFH'de “*göz değmesi*” olarak isimlendirilen nazar inancının yaygın olduğu ve nazardan korunmak için hayvanların boyunlarına mavi nazar boncuğu, muska ve içerisine taş koyulan kaplumbağa kabuğunun asıldığı, ev ve ahırlara at kafası, kaplumbağa kabuğu, büyükbaş ya da küçükbaş hayvanların kafataslarının asıldığı ve İhlas Suresinin üç kez okunarak hayvanların yüzüne doğru üfürüldüğü bulgularına ulaşıldı. Buradan hareketle nazardan korunmak ve “*göz değmesi*” olarak adlandırılan hastalıklarda yapılan uygulamaların dinî-sihri tedavi yöntemlerine örnek olarak gösterilebileceği söylenilir. Öte yandan hayvanların boyunlarına asılan kaplumbağa kabuğu içerisine taş koyulmasının, taşların çıkardığı seslerin hayvanları kötülük ve hastalıklardan koruduğuna yine ölen hayvanlardan birinin ayağı kesilerek bir ağaç dalına asılması uygulamalarının Şamanizm'de var olan kötü ruhların korkutulması uzaklaştırılması uygulamalarının (Erk 1978) devamı niteliğinde olduğu ileri sürülebilir.

Türk toplumlarında su, yaşam ve bereket kaynağı olarak kabul edilir ve Türk inanç sisteminde “*su*” iyeleri kutsaldır (Araz 1991, Akman 2002, Kalafat 1990). Akarsular, halk inanışları çerçevesinde kutsal sayılan ve adakta bulunulan unsurlardır (Kalafat 2012). Anadolu'da doğum sonrası yapılan uygulamalara ilişkin olarak plasentanın bir ağaç dalına asılması (Araz 1991, Sinmez 2011) veya suya atılması (Özen and Yüksel 2014) ayrıca, doğum sonrası sağılan ilk sütün de suya atılmasıyla (Araz 991, Özen and Yüksel 2014) ilgili inanışların varlığı daha önce yapılmış çalışmalarda bildirilmiştir. Bununla birlikte AFH'de yeni doğum yapan hayvanların düşen eşinin sütünün bol olması için bir incir ağacının üzerine asıldığı ve yine yeni doğum yapmış hayvanların eşlerinin aynı beklenti ile akarsulara atıldığı tespit edildi. Altay inanışlarına göre evcil hayvanları yaratan ve onlara bereket veren yer su iyeleri olduğu ve Türk toplumlarında suyun kutsal kabul edildiği (İnan 1998, Araz 1999) dikkate alındığında AFH'de doğum sonrası yapılan uygulamaların kutsallık ve bereket temelli olan Eski Türk inanışlarının izlerini taşıdığı söylenebilir.

Türklerde barınılan alanların koruyucu bir iyisi olduğu ki buna “*yer iyesi*” adı verildiği ve iyenin memnun edilmesi ve kızdırılmaması gerektiğine inanıldığı bilinmektedir (Kalafat 1990, Araz 1991). Bununla ilgili olarak Erzurum'da akşamları ev dışına maya; Ağrı, Elazığ ve Diyarbakır'da da ateş, ekşi hamur, tuz, iplik, Kayseri'de yün tarağı gibi nesnelere verilmemesi aksi halde evin bereketinin kaçacağı (Kalafat 1990, Özen and Yüksel 2014) şeklindeki inanışlar bulunmaktadır. Buradan hareketle AFH'de tespit edilen mayanın komşu eve verilmemesi şeklindeki inanışın ev iyisi kızdıracak davranıştan kaçınılması ve iyeiyi memnun etme ile ilişkilendirilebileceği söylenebilir.

AFH'de elde edilen bulgular arasında yer alan Adıyaman'daki hasta hayvanların Çoban Dede Köyündeki “*Çoban Dede*” adlı ziyarete götürülmesi, Çoban dedenin mezarından alınan toprak ahırın tavanına asılması uygulamalarının günümüzde hala varlığı devam eden dini-sihri tedavileri (Erk 1978) için örnek teşkil ettiği söylenebilir.

Gebelik teşhisi ve yeni doğacak yavrunun cinsiyeti ile ilgili olarak, Eski Mısırdaki çeşitli uygulamaların var olduğu bilinmektedir (Ghaloungü et al. 1963). Bununla birlikte hayvanlarda doğacak yavruların cinsiyeti ile ilgili olarak Arapça bir yazma eserde “*Erkek yavru istiyorsan sağ testisi bağlamalsın*” (Özen 1999), ve yine bir başka Arapça yazma eserde “*kasrağın önce sağ memesinden süt gelirse yavru erkek, eğer sol memeden gelirse dişi olur*” (Yiğit 2011) bilgileri yer almaktadır. Doğacak yavrunun cinsiyeti ile ilgili olarak kuzuların erkek doğması için koçların üstüne erkek çocuğu, dişi kuzu doğması için kız çocuğu bindirildiği bulguları İç Anadolu Bölgesinde yapılan folklorik bir araştırmanın sonuçları arasında yer almıştır (Sinmez and Aslım 2017). Buradan hareketle AFH'de elde edilen büyükbaş hayvanlarda çiftleştirilmeden sonra dişi hayvanın üzerine bir erkek binerse hayvanın yavrusunun erkek, eğer bir kadın binerse dişi olacağı inancının Anadolu'daki yaygın inanışlardan biri olduğu bu ve benzeri uygulamaların kökeninin Eski Mısır Uygarlığını ve yazma eserleri işaret ettiği ileri sürülebilir.

Ünver (1948), Çiçek Hastalığının çok eski tarihlerden beri bilindiğini, Eski Hint ve Çin Uygarlıklarında çiçek hastalığıyla oluşan kabarcıkların kurumuş kabuklarının burun içine sokularak aşılama yapıldığını bildirmiştir. Dinçer (1967), çiçek hastalığının tedavisinde ocak metodunun kullanıldığını, tedavide çiçek değneği ile koyunlara dokunulduğu ve çiçek hastalığı için Türklerde aşılama yönteminin kullanıldığını, Doğanay (1982) ise çiçek hastalığının sağaltımının “*çiçekçi*” adı verilen ocaklar tarafından aşılama ile yapıldığını bildirmiştir. Yerlikaya (2002), çiçek hastalığının tedavisinde büyüsel bir güç kaynağı olduğuna inanılan “*çiçek tasi*” ve “*çiçek çubuğu*”nun kullanıldığını ayrıca yine aşılama uygulamalarının var olduğunu bildirmiştir. Sinmez (2011), çiçek hastalığının tedavisinde “*çiçek tasi*”nın önemli yer tuttuğunu ve aşılama tekniğinin uygulandığını bildirmiştir. Çiçek hastalığı ile ilgili olarak AFH'de elde edilen “*çiçek tasi*”

kullanımının Yerlikaya (2002) ve Sinmez (2011)'in bulgularıyla benzer olduğu söylenebilir. Öte yandan, AFH'de çiçek hastalığının tedavisinde hayvanların çadır altına toplanıp silah sıkılarak korkutulması şeklindeki uygulamanın Türklerde Şamanizm'den kalma bir gelenek olan ve hastalıkların nedeni olduğu düşünülen kötü ruhları uzaklaştırmak için şamanın davul çalarak gürültü yapması (Erk 1978) geleneğinin devam ettiği bir göstergesi olduğu ileri sürülebilir.

Köstebeğin Eski Hint Uygarlığında sağlık dağıtan bir hayvan olarak bilindiği, eti, kanı, baş ve diş organları ya da bunların külleri hatta yuvasının topraklarının Eski Hint, Yunan ve Roma Uygarlıklarından beri kullanıldığı literatür bilgileri arasında yer almaktadır (Sigerist 1961, Dinçer 1967). Ege Bölgesinde "köstebek" adı verilen hastalığın tedavisinde köstebek etinin yedirildiği bildirilmiştir (Arslan 1998). Çalışma sonuçlarına göre, "kör fare" olarak adlandırılan köstebeğin ön iki dişinin meme hastalıklarının tedavisinde; derisi ve iç organlarının ise "kösmü baş" adı verilen beşeri hastalığın tedavisinde kullanıldığı tespit edildi. Bu bulgular Eski Hint, Yunan ve Roma Uygarlıklarından beri uygulanan benzer yöntemlerin varlığına delil sayılabilir.

Sonuç olarak, Aşağı Fırat Havzasının veteriner hekimliği folkloru açısından zengin folklorik öğeler barındırdığı; varlığı tespit edilen inanışların eski uygarlıklara kadar uzandığı söylenebilir. Bununla birlikte yörede saptanan ve inançların Anadolu'nun farklı bölgelerindekilere benzer olduğu, farklılıkların ise zaman içerisinde yeni ekleme ve değişimlerden kaynaklandığı ileri sürülebilir.

Tez Bilgileri: İlk isim yazarın "Aşağı Fırat Havzasında Veteriner Hekimliği Folkloru Üzerine Araştırmalar" başlıklı Doktora Tezi'nden özetlemiştir.

Açıklama: VII. Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Günleri (2013) özet bildiri olarak sunulmuştur.

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Akman E.** Türk ve dünya kültüründeki su kültü üzerine düşünceler. Kastamonu Eğitim Dergisi. 2020; 10 (1):1-10.
- Anonim.** Türkçe Sözlük. Cilt-2, 9. Baskı. Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara. 1998; 635.
- Araz R.** Harput'ta Eski Türk İnançları ve Halk Hekimliği. Atatürk Kültür, Dil ve Tarih Yüksek Kurumu Yayınları, No:108, Levent Ofset Matbaacılık, Ankara. 1991.
- Arslan ES.** Ege Bölgesi Folklorunda Veteriner Hekimliği ve Hayvancılık Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998.
- Artun E.** Tekirdağ'da batıl inanışlar. Tekirdağ Halk Kültürü Araştırmaları 1. 1998; 66-83.

- Boratav PN.** Türk halkbilimi II / 100 Soruda Türk Folkloru (İnanışlar, Töre ve Törenler, Oyunlar). Gerçek Yayınevi, İstanbul.1994; 122.
- Buran A.** Fırat Havzasında Eski Türk Gelenek ve Göreneklere. Fırat Üniversitesi Fırat Havzası Folklor ve Etnografya Sempozyumu (24-27 Ekim 1985), Elazığ. 1992; 33-44.
- Çetin ÇZ.** Tatar Türklerinde mitolojik varlıklarla ilgili mitler ve inanışlar (iyeler ve yaratıklar). Bilig. 2007; 43:1-32.
- Dinçer F.** Türk Folklorunda Veteriner Hekimliği Üzerine Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları: 214, Ankara, 1967.
- Dinçer F.** Türk Folklorunda Veteriner Hekimlik (Beş Doğu İlimizde Yeni Örnekleriyle). I. Ulusal Türk Folklor Kongresi Bildirileri, Cilt 4, DSİ Basım ve Foto Film İşletme Müdürlüğü, Ankara, 1976.
- Dinçer F.** A report on the Folklore Activities and Folk Veterinary Medicine in Turkey. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1980; 18 (2): 237-45.
- Doğanay S.** Afyon Folklorunda Veteriner Hekimlik Araştırma ve İncelemeleri. II. Milletlerarası Türk Folklor Bildirileri Cilt 4, G. Ü. Basım-Yayın Yüksekokul. Basımevi, Ankara, 1982; 131-151.
- Dundes A.** Aydın G (Çeviren). Folklor Nedir? Milli Folklor Dergisi. 2005; 9 (65): 127-130.
- Duvarcı A.** Türklerde tabiat üstü varlıklar ve bunlarla ilgili kabuller, inanmalar, uygulamalar. Bilig. 2005; 32:125-44.
- Ekici M. Halk, Halk Bilimi ve Halk Bilgisi Üzerine Bir Deneme.** Milli Folklor Dergisi. 2000; 6 (45): 2-9.
- Ergun P.** Alevilik -Bektaşilikteki tavşan inancının mitolojik kökenleri üzerine. Türk Kültürü ve Hacı Bektaş Veli Araştırma Dergisi. 2011; 60: 281- 312.
- Erk N.** Veteriner Tarihi. 2. Baskı, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, 1978.
- Ghalioungui P, Khalil SH, Ammar AR.** On an Ancient Egyptian Method of Diagnosing Pregnancy and Determining Foetal Sex. Med. Hist. 1963; 7 (3): 241 – 248.
- İnan A.** Türklerde Su Kültü ile İlgili Gelenekler. Makaleler İncelemeler, Cilt-I, Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara, 1998.
- İnan A.** Tarihte ve Bugün Şamanizm: Materyal ve Araştırmalar. Türk Tarih Kurumu Basımevi, Ankara, 2000.
- Kalafat Y.** Doğu Anadolu'da Eski Türk İnançlarının İzleri. Türk Kültürünü Araştırma Enstitüsü Yayınları, Ankara, 1990; 50, 56, 77, 97,98.
- Kalafat Y.** Türk Halk İnançlarında Tabu. Berikan Yayınevi, Ankara, 2012; 68, 122, 123.
- Karaboran H.** Folklor Açısından Doğu Anadolu Bölgesinde Köy Araştırmalarının Önemi. Fırat Üniversitesi Fırat Havzası Folklor ve Etnografya Sempozyumu (24-27 Ekim 1985), Elazığ, 1992; 143-155.
- Kılıç A.** Isparta yöresi halk inançları. Uluslararası Anadolu İnançları Kongresi. 23-28 Ekim, Ürgüp (Nevşehir)-Türkiye, 2000.

- Kurum U.** Düziçi’nde Halk Hekimliği. Doktora Tezi, Niğde Üniversitesi Sosyal Bilimleri Enstitüsü, Niğde, 2008.
- Kutlu MM.** Şavaklı Türkmenlerde Göçer Hayvancılık. Sevinç Matbaası, Ankara, 1987.
- Küçükaslan Ö, Uçar M.** Diyarbakır Folklorunda Hayvanlar Üzerine Bir Araştırma. Eurasian Journal of Veterinary Sciences. 2016; 32 (4): 220-228.
- Mollaibrahimoğlu Ç.** Anadolu Halk Kültüründe Hayvanlar Etrafında Oluşan İnanç ve Pratikler. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniv. Sosyal Bilimler Enstitüsü Türk Dili ve Edebiyatı Programı, Trabzon-Türkiye, 2008.
- Ögel B.** Türk Mitoloji I. Cilt. İkinci Baskı, TTK Basımevi, Ankara. 1993; 560.
- Özen A.** Millî Kütüphanedeki Yazma Baytarnameler Üzerinde Tarihsel İncelemeler. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara: 1999.
- Özen R.** Kayseri Folklorunda Evcil Hayvanlarla İlgili Atasözleri. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2006; 3 (2): 177-121.
- Özen R, Yüksel E.** Kayseri Folklorunda Hayvanlar İle İlgili İnanışlar Üzerine Bir Değerlendirme. Erciyes Üniv Vet Fak Derg. 2014; 11 (1): 23-28.
- Roux JP.** Orta Asya’da Kutsal Bitkiler ve Hayvanlar. Kabalcı Yayınevi, İstanbul. 2005; 76, 80.
- Salman M.** Halk Hekimliği ve Halk Veterinerliği. Milli Kültür Araştırmaları: VIII, Ulus Basımevi, Ankara. 1948; 35-66.
- Sigerist HE.** A History of Medicine Volume II Early Greek, Hindu and Persian Medicine. Oxford Universty Press, Newyork. 1961.
- Sinmez ÇÇ.** Bozlak Kültüründe Folklorik Veteriner Hekimliği ve Hayvancılık Üzerine Araştırma. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya: 2011.
- Simez ÇÇ, Aslım G.** İç Anadolu Bölgesindeki Hayvanlarla İlgili İnanış ve Uygulamalar Üzerine Bir Değerlendirme. Bilig, 2017; 81: 205- 232.
- Tan N.** Folklor (Halk Bilimi) Genel Bilgiler. Genişletilmiş 7. Baskı, Özal Matbaası, İstanbul. 2008.
- Tavkul U.** Kültürel etkileşim açısından On İki Hayvanlı Türk Takviminin yayılışı. Modern Türklük Araştırmaları Dergisi. 2007; 4(1): 25-45.
- Ülkütaşır MŞ.** Cumhuriyet’le Birlikte Türkiye’de Folklor ve Etnografya Çalışmaları. Başbakanlık Kültür Müsteşarlığı Cumhuriyet 50. Yıldönümü Yayınları: 1, Başbakanlık Basımevi, Ankara. 1972.
- Ünver AS.** Türkiye’de Çiçek Aşısı ve Tarihi. İstanbul Üniversitesi Tıp Tarihi Enstitüsü No: 38, İsmail Akgün Matbaası, İstanbul. 1948
- Toygar K** Türkiye Folklorunun Derleme Öncelikleri İçerisinde “Fırat Havzası Folkloru”nun Önemi. Fırat Üniversitesi Fırat Havzası Folklor ve Etnografya Sempozyumu (24-27 Ekim 1985), Elazığ, 1992; 357-363.
- Yerlikaya H.** Elazığ ve Çevresinde Hayvan Hastalıklarında Halk Hekimliği Üzerine Araştırmalar. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2002; 8 (2): 131-138.
- Yıldız ŞN.** Türk Halk Anlatılarında Hayvan Motifleri. Yüksek Lisans Tezi. Fırat Üniv. Sosyal Bilimler Enstitüsü Türk Dili ve Edebiyatı Programı. Elazığ-Türkiye, 2011.
- Yiğit A.** “İlm-i Fürusiyet” İsimli Baytarnamenin Veteriner Hekimliği Tarihi, At Yetiştiriciliği ve Hastalıkları Açısından Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya: 2011.
- Yuvalı A.** Fırat Havzası’nın Türk Tarihindeki Yeri. Fırat Üniversitesi Fırat Havzası Folklor ve Etnografya Sempozyumu (24-27 Ekim 1985), Elazığ, 1992; 389-398.

Kaynak Kişi Listesi

Kod No.	Adı-Soyadı	Doğum Tarihi	Meslek	Ařiret	Görüşme Tarihi	Köy /Belde	İl-İlçe
1	Seydi DİLEK	1968	Vet. Hek.	-	06.11.2010	Geçitli Köyü	Besni –Adıyaman
2	Vakkas SADIK	1933	Çiftçi	-	06.11.2010	Karagüveç Köyü	Besni –Adıyaman
3	Mustafa SADIK	1956	Esnaf	-	06.11.2010	Karagüveç Köyü	Besni –Adıyaman
4	Vakkas TÜRK	1945	Çiftçi	-	06.11.2010	Kidiř Köyü	Besni –Adıyaman
5	Vakkas GÜNGÖR	1965	Çiftçi	-	06.11.2010	Balmir Köyü	Besni –Adıyaman
6	Osman ÖZDEMİR	1956	Çiftçi	-	07.11.2010	Tek Ağaç Köyü	Besni –Adıyaman
7	Şükrü TANIR	1973	Çiftçi	-	07.11.2010	Tek Ağaç Köyü	Besni –Adıyaman
8	Osman BÖRTA	1952	Çiftçi	-	07.11.2010	Tek Ağaç Köyü	Besni –Adıyaman
9	Hasan ASLAN	1973	Çiftçi	-	10.11.2010	Ortanca Köyü	Kâhta-Adıyaman
10	Mustafa KAMER	1960	Çiftçi	-	10.11.2010	Tuęlu Köyü	Kâhta-Adıyaman
11	İbrahim DOğRU	1952	Çiftçi	-	11.11.2010	Tekayaz Köyü	Kâhta-Adıyaman
12	Muhammed ALTUę	1929	Çiftçi	-	12.11.2010	Şahintepe Köyü	Kâhta-Adıyaman
13	Mehmet DOğAN	1941	Çiftçi	-	12.11.2010	Şahintepe Köyü	Kâhta-Adıyaman
14	Ömer TOSUN	1934	Çiftçi	-	12.11.2010	Şahintepe Köyü	Kâhta-Adıyaman
15	Mehmet ASLAN	1943	Çiftçi	-	13.11.2010	Bozik Köyü	Merkez Adıyaman
16	Hacı Halit ASLAN	1944	Çiftçi	-	13.11.2010	Bozik Köyü	Merkez Adıyaman
17	Yusuf ASLAN	1958	Şöför	-	13.11.2010	Bozik Köyü	Merkez Adıyaman
18	Mehmet GÜLER	1936	Çiftçi	-	13.11.2010	Bozik Köyü	Merkez Adıyaman
19	Mustafa DİŞKIRAN	1952	Çiftçi	-	14.11.2010	Çoban Dede	Merkez -Adıyaman
20	Abuzer YALÇIN	1950	Çiftçi	-	14.11.2010	Çoban Dede	Merkez -Adıyaman
21	Hacı DEMİRBAI	1949	Çiftçi	-	14.11.2010	Çoban Dede	Merkez -Adıyaman
22	Yusuf DEMİRBAI	1948	Çiftçi	-	14.11.2010	Çoban Dede	Merkez -Adıyaman
23	Yusuf ERGÜR	1938	Çiftçi	-	15.12.2010	Koruk Köyü	Merkez-Elazığ
24	Fikret ASLAN	1949	Çiftçi	-	15.12.2010	Koruk Köyü	Merkez-Elazığ
25	Sündüz ASLAN	1947	Ev Hanımı	-	15.12.2010	Koruk Köyü	Merkez-Elazığ
26	Zeki TAN	1939	Çiftçi	-	16.12.2010	Sün Köyü	Merkez-Elazığ

27	Hasan ÖNAY	1933	Öğretmen Emekli	-	16.12.2010	Sün Köyü	Merkez-Elazığ
28	Güllü ÖNAY	1941	Ev Hanımı	-	17.12.2010	Sün Köyü	Merkez-Elazığ
29	Cumaali GÖKSU	1926	Çiftçi	-	17.12.2010	Sün Köyü	Merkez-Elazığ
30	Makbule GÖKSU	1935	Ev Hanımı	-	17.12.2010	Sün Köyü	Merkez-Elazığ
31	Turan ÇALDAK	1948	Çiftçi	Şavak	18.12.2010	Meşeli Köyü	Merkez-Elazığ
32	Bekir GÖREN	1957	Çiftçi	Şavak	19.12.2010	Salkaya Köyü	Merkez-Elazığ
33	Sefer ALTUN	1936	Çiftçi	Şavak	19.12.2010	Salkaya Köyü	Merkez-Elazığ
34	Halil ÇALDAK	1934	Çiftçi	Şavak	19.12.2010	Salkaya Köyü	Merkez-Elazığ
35	Metin Baki ÖLÇÜCÜ	1967	Çiftçi	Beritan	20.12.2010	-	Kovancılar -Elazığ
36	Mehmet Emin AKDAĞ	1963	Çiftçi	Beritan	20.12.2010	-	Kovancılar -Elazığ
37	Bekir BARAÇ KILIÇ	1969	Çiftçi	Beritan	20.12.2010	-	Kovancılar -Elazığ
38	Celal DEMİRELLİ	1959	Çiftçi	Beritan	20.12.2010	Yeni Dam Köyü	Kovancılar -Elazığ
39	Ali ŞENER	1955	Çiftçi	Beritan	21.12.2010	İğdeli Köyü	Kovancılar -Elazığ
40	Nedim BULUT	1950	Kasap	-	26.12.2010	Gevence Köyü	Nizip-Gaziantep
41	Mehmet BULUT	1951	Esnaf	-	26.12.2010	Gevence Köyü	Nizip-Gaziantep
42	Radiya KESKİN	1946	Ev Hanımı	-	27.12.2010	Sekile Köyü	Nizip-Gaziantep
43	Musa KESKİN	1985	Çiftçi	-	27.12.2010	Sekile Köyü	Nizip-Gaziantep
44	Mustafa KANPOLAT	1942	Çiftçi	-	28.12.2010	Söğütlü Köyü	Nizip-Gaziantep
45	Bilal ALPARSLAN	1929	Çiftçi	-	28.12.2010	Söğütlü Köyü	Nizip-Gaziantep
46	Mehmet YÜKSEKAĞAÇ	1963	Vet. Hek.	-	01.12.2010	-	Battalgazi-Malatya
47	Kemal YEŞİLÇAYIR	1968	Vet. Hek.	-	01.12.2010	-	Battalgazi-Malatya
48	Hüseyin ERDEMİR	1967	Vet. Hek.	-	01.12.2010	-	Battalgazi-Malatya
49	Ramazan KOÇ	1959	Çiftçi	-	01.12.2010	Karabağlar Köyü	Battalgazi-Malatya
50	Hacı KALAY	1943	Çiftçi	-	01.12.2010	Kıraç Köyü	Battalgazi-Malatya
51	Hasan YİĞİTCAN	1955	Çiftçi	-	02.12.2010	Yenimahalle Köyü	Battalgazi-Malatya
52	Vahap ALTUN	1955	Çiftçi	-	02.12.2010	Yenimahalle Köyü	Battalgazi-Malatya
53	Mehmet AKBAŞ	1950	Çiftçi	-	04.12.2010	Günedoğru Köyü	Doğanşehir-Malatya
54	Hasan ÇUBUK	1962	Çiftçi	-	04.12.2010	Günedoğru Köyü	Doğanşehir-Malatya
55	Şahin EROL	1948	Çiftçi	-	05.12.2010	Polat Beldesi	Doğanşehir-Malatya

56	Hasan ÖZCAN	1932	Çiftçi	-	07.12.2010	Söğüt Beldesi	Doğuşehir-Malatya
57	Hacı ALTUNTAŞ	1931	Çiftçi	-	07.12.2010	Söğüt Beldesi	Doğuşehir-Malatya
58	Haydar GÜLER	1937	Çiftçi	-	07.12.2010	Söğüt Beldesi	Doğuşehir-Malatya
59	İbrahim MARAŞ	1933	Çiftçi	-	07.12.2010	Söğüt Beldesi	Doğuşehir-Malatya
60	Necmettin ATEŞ	1953	Çiftçi	-	09.12.2010	Kadir Uşığı Köyü	Yeşilyurt-Malatya
61	Aydın ARSLAN	1961	Çiftçi	-	09.12.2010	Kadir Uşığı Köyü	Yeşilyurt-Malatya
62	Ahmet GÜLMEZ	1952	Vet. Hek.	-	22.10.2010	-	Merkez-Şanlıurfa
63	Halil RUŞEN	1969	Vet. Hek.	-	22.10.2010	-	Merkez-Şanlıurfa
64	Bahaddin KARADAĞ	1952	Çiftçi	Getikan	23.10.2010	Düzlüce Köyü	Birecik-Şanlıurfa
65	Ramazan ÇOBAN	1941	Çiftçi	Şavak	24.10.2010	Divrik Köyü	Birecik-Şanlıurfa
66	Abdullah GÜNEŞ	1937	Çiftçi	Şavak	24.10.2010	Divrik Köyü	Birecik-Şanlıurfa
67	Mahmut DEMİR	1955	Çiftçi	Şavak	24.10.2010	Unser Köyü	Birecik-Şanlıurfa
68	Aziz DEMİR	1966	Çiftçi	Şavak	24.10.2010	Unser Köyü	Birecik-Şanlıurfa
69	Mehmet BİLENLER	1950	Çiftçi	-	25.10.2010	Gözenek Köyü	Bozova-Şanlıurfa
70	Şükrü BİLENLER	1963	Çiftçi	-	25.10.2010	Gözenek Köyü	Bozova-Şanlıurfa
71	Mehmet ÇELİK	1943	Çiftçi	-	25.10.2010	Türkmen veren Köyü	Bozova-Şanlıurfa
72	Güzel ŞAHİN	1931	Ev Hanımı	-	26.10.2010	Argıl Kasabası	Halfeti-Şanlıurfa
73	Mehmet Ali ŞAHİN	1943	Çiftçi	-	26.10.2010	Argıl Kasabası	Halfeti-Şanlıurfa
74	Haydar ŞAHİN	1945	Çiftçi	-	26.10.2010	Argıl Kasabası	Halfeti-Şanlıurfa
75	Ayşe ŞAHİN	1955	Ev Hanımı	-	27.10.2010	Argıl Kasabası	Halfeti-Şanlıurfa
76	Recep TEKİNALP	1946	Çiftçi	Beni Muhammedi	28.10.2010	Karatepe Köyü	Akçakale-Şanlıurfa
77	Halil ÖZÇELİK	1957	Çiftçi	Beni Muhammedi	28.10.2010	Karatepe Köyü	Akçakale-Şanlıurfa
78	Salih CAFİN	1933	Çiftçi	Beni Muhammedi	29.10.2010	Doram Ali Köyü	Akçakale-Şanlıurfa

Incidence of Periodontal Disease and Treatment Options in Cat and Dogs

Nedime ATAGÜR SELEK¹, Mustafa ARICAN²

¹Petcode Animal Hospital, Ankara, Turkey

²Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Konya, Turkey

ABSTRACT

The aim of this study is to reveal the incidence of periodontal disease in dogs and cats. In this study, 150 dogs and cats of different breeds, weights and ages, which were brought to S.U. The Faculty of Veterinary Medicine, Surgery Department, Konya and Petcode Animal Hospital, Ankara, were used. The cases were evaluated according to parameters such as periodontal disease, gingivitis, tooth decay, abrasion, milktooth, enamel defect, fracture, gingival hyperplasia and recession, stomatitis, and tooth resorption. Clinical and radiological examinations were performed. While 89 of the cats are female, 61 of the male and in dogs this ratio is 72 females and 78 males. The susceptibility to periodontal disease in cats was observed around 75% in cross breeds and Scottishfolds; The susceptibility to disease was recorded as 80% in small breed dogs. Periodontal disease was observed in at least 1 tooth of 80% of the patients aged two years. In cats, it was observed that the maxillary 108th and 208th teeth had problems while the 107th and 207th teeth were also affected. 60% of dogs over 5 years old have periodontal disease due to chips fracture (108th and 208th teeth). 33 of 150 cats had gingivostomatitis, 14 had total tooth extraction. As a result of the surveys, it was noted that 38 of the cat owners knew that they should brush their teeth, 11 of them brush their teeth regularly and 9 of them were not pathological. It is emphasized that 87 of the dog owners knows brushing, but 42 of them brush teeth. As a result, it has been observed that giving puppies and dogs the habit of brushing teeth during the first six months is essential for the protection of oral and dental health. Clients should be informed about oral and dental health by veterinarians and it should be shown that the susceptibility to periodontal disease is directly proportional to age and home care.

Keywords: Dentalcare, gingivitis, cats, dogs, periodontitis

Kedi ve Köpeklerde Periodontal Hastalığın Oluşma İnsidansı ve Tedavi Seçenekleri

ÖZ

Bu çalışmada kedi ve köpeklerde periodontal hastalığın insidansının ortaya konması amaçlanmıştır. Çalışmada S.Ü. Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı, Konya ve Petcode Hayvan Hastanesine, Ankara, getirilen 150'şer adet farklı cins, ırk, ağırlık ve yaşta köpek ve kedi kullanıldı. Olgular periodontal hastalık, gingivitis, diş çürüğü, aşınma, süt dişi, mine defekti, kırık, gingival hiperplazi ve çekilme, stomatit, diş rezorpsiyonu gibi parametreler göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Klinik ve radyolojik muayeneler yapıldı. Kedilerin 89'u dişi ve 61 tanesi erkek, köpeklerde ise bu oran 72 dişi, 78 erkektir. Kedilerde periodontal hastalığa yatkınlık melez ırklarda ve Scottish fold'larda %75 civarında gözlenirken; küçük cins köpeklerde hastalığa yatkınlık %80 olarak kaydedilmiştir. İki yaşındaki hastaların %80'ninin en az 1 dişinde periodontal hastalık gözlemlendi. Kedilerde ilk olarak maksillar 108. ve 208. dişlerinde problem görülürken, bunu takiben 107. ve 207. dişlerinin de etkilendiği görülmüştür. Küçük parça (cips) kırığı (108. ve 208. dişler) sebebiyle 5 yaşını aşmış köpeklerin %60'ında periodontal hastalık mevcuttur. 150 kediden 33'ünde feline mukozit (gingivostomatit) görülürken 14'ünde total diş çekimi yapılmıştır. Yapılan anketler sonunda kedi sahiplerinin 38 tanesinin dişlerini fırçalaması gerektiğini bilirken, 11 tanesinin düzenli diş fırçaladığı ve 9 tanesinin ağzının patolojik olmadığı not edilmiştir. Köpek sahiplerinin ise 87 tanesi diş fırçalaması gerektiğini bildiği halde, 42 tanesi diş fırçalamaktadır. Sonuç olarak, ilk altı aylık sürede yavru kedi ve köpeklere diş fırçalama alışkanlığı kazandırmak ağız ve diş sağlığının korunması için esas şart olduğu görülmüştür. Veteriner hekimler tarafından hasta sahipleri ağız ve diş sağlığı yönünden bilgilendirilmeli ve periodontal hastalığa yatkınlığın yaş ve evde bakım ile doğru orantılı olduğu gösterilmelidir.

Anahtar kelimeler: Diş bakımı, gingivitis, kedi, köpek, periodontitis

To cite this article: Atagür Selek N. Arıcan M. Kedi ve Köpeklerde Periodontal Hastalığın Oluşma İnsidansı ve Tedavi Seçenekleri. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):101-112

Submission: 07.10.2020 Accepted: 19.01.2021 Published Online: 26.02.2021

ORCID ID: N/A S: 0000-0002-6557-5978, M/A: 0000-0001-8180-135X

*Corresponding author e-mail: marican@selcuk.edu.tr

GİRİŞ

Periodontal hastalığın gelişimi ile ilgili birçok faktör etkili olsa da asıl teşvik edici etiyolojik ajan ve plak oluşumunu sağlayan bakterilerdir (Bellow ve ark 2019). Yapılan çalışmada, diş etlerinin bakteriyel biyo-filmle maruz kalması sonucu yangı oluşur ve biyo-film oradan uzaklaştırılmazsa problem devam eder (Bellow ve ark 2019). Peridontal hastalık gingivitis ve periodontitis olmak üzere iki aşamada tanımlanmaktadır. Gingivitis yani diş eti yangısı diş etinde yerleştiği sürece geri dönüşümü olan bir patolojidir (Merin 2006). Dental plak oluşturan bakterileri tarafından başlatılan diş eti yangısı tam bir diş profilaksisi ve evde özenli bir bakım ile tersine çevrilebilir (Merin 2006). Periodontitis, hastalık sürecinin sonraki aşamasıdır ve mikroorganizmaların neden olduğu ve dişin daha derin destekleyici yapılarının (peridontal ligament ve alveolar kemiğin) inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlanır (Niemic 2008).

Periodontal hastalığın oluşumu için yukarıdaki sebeplerin olması yeterli iken bireysel farklılıkların nedeni açıklanamamaktadır. Küçük ve orta ırk köpeklerde büyük ırklara göre periodontal hastalığın daha sık görüldüğünü bilmek gerekir. Asıl nedeninin bilinmemesine rağmen köklerinin kısa oluşu, çiğneme aktivitesinin azalması gibi sebeplerin yatkınlık oluşturduğu düşünülmektedir (Bellows 2004). Endokrin hastalıklar, periodontal hastalığı etkileyen en yaygın problemlerdir. Uzun yıllar diabetin komplikasyonu olarak periodontal hastalık bilinmektedir (Klokkevold ve Mealey 2006). Bunun başlıca nedeni diabetin enfeksiyonlara duyarlılığı arttırması ve yara iyileşmesini geciktirmesidir (Lerman ve ark 2003). Kortikosteroidlerin de bu hastalık üzerinde arttırıcı etkisi vardır. İmmun sistemi baskılamaları sebebiyle peridontal patojenleri içeren ajanlara karşı savunmayı azaltmaktadır (Feldman ve Nelson 2004). Ayrıca deney hayvanlarında sistemik kortizon uygulamasının yara iyileşmesini geciktirmesinin yanında alveolar kemik osteoporozuna, kollajen yıkımı ve periodontal dokuların tahribatına yol açtığı belirlenmiştir.

Periodontal hastalık derecesi için temel klinik diaznoz, semento-enamel bileşke ile mevcut diş eti arasındaki mesafedeki bağlanma kaybıdır (Beck ve Arbes 2006). Cep derinliği ölçülürken ırklar ve cinsler göz önünde bulundurulmalıdır. Tam anlamıyla periodontal hastalık teşhisi koyabilmek için periodontal prob ve radyografiye ihtiyaç vardır (Wiggs ve Lobprise 1997). Aynı hastanın farklı dişlerinde hastalık derecesi farklı olabilir. Kedilerde genellikle bu cep derinliğinin maksimum 0,3 mm olması istenir. Klinik olarak periodontal hastalığı tanımaya çalışırken dişlerin furkasyo bölgelerinin açıkta olması tanıyı güçlendirir. Periodontal endodontik etkileşimden büyük oranda sorumlu olan aksesuar kanalların çoğunluğu, dişlerin apikalinde ve molar dişlerin furkasyon bölgesinde bulunmaktadır. Kronun yıkımı sebebiyle kedilerde oldukça erken gerçekleşir. 1 mm kadar alveolar kemik

kaybı furkasyo bölgesinin açığa çıkması için yeterlidir (Beckman 2012). Normal ağız yapısında (periodontal disease olmayan (PD0)), belirgin olarak yangı ve periodontitis görülmez. Evre I (periodontal disease 1 (PD1)), bu grup hastalarda dişin bağlanma kaybı yoktur sadece diş eti yangısı mevcuttur. Alveolerin sınırının yüksekliği ve görünümü normaldir. Evre II periodontal disease 2 (PD2); erken periodontitis oluşum dönemidir. Dişteki bağlanma kaybı %25'in altındadır. Evre III periodontal disease 3 (PD3); orta periodontitis dir. Dişteki bağlanma kaybı %25-50 arasındadır. Evre IV periodontal disease 4 (PD4); en az 3 adet furkasyo alanı vardır. Dişlerde aşırı mobilite görülür. Dişlerin bağlanma kaybı %50'nin üzerindedir. Periodontal hastalığın belirtilerinden biri de ağız kokusudur. Bir hastada periodontal hastalık olmadığı halde ağız kokusu varsa ketosiz, üremi, kronik karaciğer hastalığı, sinüzitis, kronik bronşit, gastrointestinal hastalık, nekroz, oral tümörler veya enfekte olmuş yabancı bir cisim akla gelmelidir (Quirynen ve van Steenberghe 2006).

Sunulan çalışmada ülkemizde popülasyonu günden güne artan kedi ve köpeklerin temel fizyolojik ihtiyaçlarını karşılamak için beslenme davranışının ilk basamağı olan ağız ve diş sağlığına dikkat çekmek amacıyla, bu hastalığın insidansını ortaya konması amaçlanmıştır. Özellikle kedi ve köpeklerde yaş, ırk, hayvan sahibinin ilgisinin hastalığı oluşturma veya geciktirme etkisine bakılmıştır. Ayrıca, bu çalışmada özellikle köpek kedilerde oluşan diş ve diş eti arasındaki periodontal ligamentin varlığı, önemi, korunması ve buna yönelik tedaviler üzerinde durulmuştur.

GEREÇ ve YÖNTEM

Gereç

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, Konya ve Petcode Hayvan Hastanesi, Ankara, kliniğe başvuran ve herhangi bir nedenle anesteziye alınması gereken (röntgen, ultrason, muayeneye izin vermeyen, diş hastalıkları, kulak hastalıkları, göz hastalıkları, küçük çaplı dikiş uygulamaları, apse drenajı, bandaj uygulamaları vb.) farklı ırk, yaş ve cinsiyette 150 kedi ve 150 köpek toplamda 300 olgu üzerinde yapıldı. Olguların cinsiyet dağılımlarına bakıldığında 89 tane dişi ve 61 tane erkek kedi, 72 tanesi dişi ve 78 tanesi erkek köpek oluşturdu. Çalışmaya Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) tarafından onay alındıktan sonra başlanmıştır (28.12.2018 tarihli, 2018/14 toplantı sayılı, 2018/185nolu karar).

Yöntem

Kliniğe getirilen kedi ve köpeklerin fiziksel muayenesi yapıldı. Fiziksel muayene için ön bakıda diş sayısı, gingiva rengi, hacmi, ağız kokusu, süt dişlerinin varlığı, ağzın simetrik olup olmaması, oral mukozada lezyon varlığı göz önünde bulundurularak değerlendirildi. Ardından periodontal prob yardımı ile her bir diş en az

4 noktasından (ideali 8 noktadan sondalamaktır) girilerek derinlik (periodontal cep) ölçülüp ortalama değeri not edilmiştir. Bunu takiben diş çürüğü, aşınma, süt dişi, mine defekti, mine hipoplazisi, kırık, gingival hiperplazi ve çekilme, oral kitle, oro-nasal fistül, pulpanın açığa çıkması, kalmış kök, stomatit, diş rezorpsiyonu varlığı tespit edilmiş ise muayene formuna not edildi (Şekil 1,2). Fiziksel muayenenin

ardından röntgen çekilerek, fiziksel muayenede görülemeyecek olan dişlerin apeksindeki apse, kök rezorpsiyonu, alveolar kemik kaybı gözlenen dişler hemen tedaviye alınmıştır. Ayrıca hasta sahipleri ile ağız diş sağlığına dikkat çekmek için yapılan anket sonuçları ile 150 kedi ve 150 köpeğin muayene bulguları karşılaştırılmıştır (Tablo 1).

PETCODE
HAYVAN HASTANESİ

KEDI DENTAL MUAYENE FORMU

Adı: Vücut No:

Adı:

101 102 103 104 105 106 107 108 109

401 402 403 404 405 406 407 408 409

MAXİLLAR			
101	201		
102	202		
103	203		
104	204		
105	205		
106	206		
107	207		
108	208		
109	209		

301 302 303 304 305 306 307 308 309

401 402 403 404 405 406 407 408 409

MANDİBULAR			
301	401		
302	402		
303	403		
304	404		
305	405		
306	406		
307	407		
308	408		
309	409		

AB Ağızma	GB Gingival Çekilme	
AD Çiğneme Yetersiz Ağızması	GM Oral Kitle	
CA Çürük	GNF Oro-Nasal Fistüle	
SD Süt Dişi	PA Pulpa Açığı Çekim	
E/D Mine Defekti	RI Kök Açığı Çekim	
EM Mine Hipoplazisi	REK Kalsiyum Eksikliği	
FA Fark	SR Stomatit	
GR Buccal Granülom	ST Stomatit	
GR2 Lingual Granülom / Buzaklı	TR Diş Resorpsiyonu	
	1 Sadece mine	3 Pulpa'ya dokunmuş
	2 Dişin'e dokunmuş	4 Ağız sızması hastası
		5 Kırık diş, kökleri kalıyor

NOT: Sürat simetrik mi?

Ağız kokusu var mı?

Sürat değişimi diklemiş mi?

Ağız içlerinde lezyon var mı?

Gizim:

Rizit Galip Cad. No.111
Göç. ANKARA
444 74 800
www.petcode.com.tr

Şekil 1. Kedi muayene formu

PETCODE
HAYVAN HASTANESİ

KÖPEK DENTAL MUAYENE FORMU

Adı: Vücut No:

Adı:

101 102 103 104 105 106 107 108 109 110

401 402 403 404 405 406 407 408 409 410

MAXİLLAR			
101	201		
102	202		
103	203		
104	204		
105	205		
106	206		
107	207		
108	208		
109	209		
110	210		

301 302 303 304 305 306 307 308 309 310

401 402 403 404 405 406 407 408 409 410

MANDİBULAR			
301	401		
302	402		
303	403		
304	404		
305	405		
306	406		
307	407		
308	408		
309	409		
310	410		
311	411		

AB Ağızma	GB Gingival Çekilme	
AD Çiğneme Yetersiz Ağızması	GM Oral Kitle	
CA Çürük	GNF Oro-Nasal Fistüle	
SD Süt Dişi	PA Pulpa Açığı Çekim	
E/D Mine Defekti	RI Kök Açığı Çekim	
EM Mine Hipoplazisi	REK Kalsiyum Eksikliği	
FA Fark	SR Stomatit	
GR Buccal Granülom	ST Stomatit	
GR2 Lingual Granülom / Buzaklı	TR Diş Resorpsiyonu	
	1 Sadece mine	3 Pulpa'ya dokunmuş
	2 Dişin'e dokunmuş	4 Ağız sızması hastası
		5 Kırık diş, kökleri kalıyor

NOT: Sürat simetrik mi?

Ağız kokusu var mı?

Sürat değişimi diklemiş mi?

Ağız içlerinde lezyon var mı?

Gizim:

Şekil 2. Köpek muayene formu

Tablo 1: Gelen hasta sahipleri ile yapılan anketin soruları

Anket soruları	Evet	Hayır
Ağız kokusu var mı ?		
Ağız sağlığını kontrol ediyor/edebiliyor musunuz ?		
Süt dişlerinin tamamen düştüğüne emin misiniz ?		
Kedi ve köpeklerin kaç dişi olduğunu biliyor musunuz? Dişlerini hiç saydınız mı ?		
Çene yapısının normal ve sağlıklı olduğunu düşünüyor musunuz ?		
Yeme, kemirme ya da çiğneme güçlüğü olduğunu düşünüyor musunuz?		
Kuru mama tüketiminin diş taşı oluşumunu önlediğini düşünüyor musunuz ?		
Dişlerini fırçalayabiliyor musunuz?		
Haftada ağız-diş bakımı için ne kadar zaman harcıyorsunuz ?		

Fiziksel Muayene

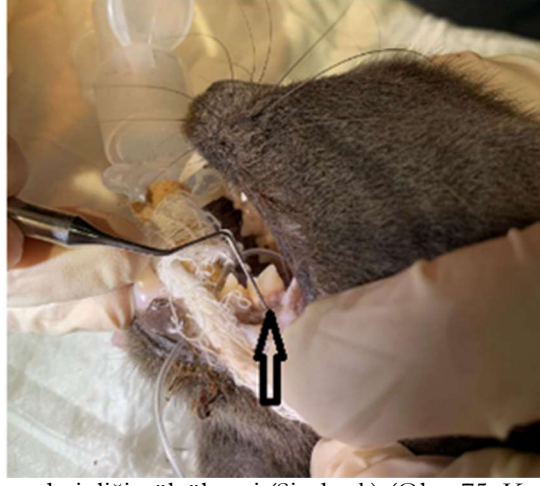
Tam fiziksel muayene hastalara sedasyon uygulamadan önce ışılandırmanın iyi olduğu, rahat ve sakin bir muayene odasında yapılmıştır. Muayene olabildiğince eksiksiz yapılarak; vücut kondisyonu, göz ve kulak muayene bulguları, troid bezi de dahil olmak üzere bütün boyun palpasyon bulguları, tüm yüzeysel lenf yumrularının elle muayene bulguları, kapsamlı kardio-toraksik değerlendirme sonuçları, elle abdomen/ürogenital muayene bulguları, mental durum, tüy yapısı ve kalitesi gibi parametreler değerlendirilmiştir. Yapılan fiziksel muayene sonunda ağız diş sağlığı ile ilgili problemi olan hastaların birçoğunda tüy yapısının ve kalitesinin bozuk olduğu görülmüştür. Fiziksel muayene ve anamnez sırasında agresif olmadığı bilgisi alınan hastaların ağız kontrolüne izin vermediği durumlarda şiddetli periodontit olguları ile karşılaşmıştır. Palpasyon ve inspeksiyon ile başlatılan muayene hastaların pre-anestezik kan biyokimyası ve hemogram bakı işlemleri bittikten sonra sedasyona alınarak ve ağız haritası çıkartılmıştır. Pre-anestezik incelemede hastanenin

rutin protokolü olan tam kan sayımı, üre, kreatinin, glukoz, gpt ve total protein seviyeleri değerlendirilmiştir (Tam kan sayım cihazı Mindray BC-5000Vet, 2015, Almaya ve Biyokimya cihazı FujiDri-Chem NX700i, 2018, Japonya).

Klinik muayenenin ardından anestezi eşliğinde detaylı ağız muayenesi yapılmıştır. Köpekler ve kedilerin ağız muayenesinde sedasyon için; kedilerde: 0,08 mg/kg Domitor (1 mg/ml medetomidin hidroklorid, Pfizer, Finlandiya) ve 4-6 mg/kg, Propofol (4 mg/kg, IV, Propofol-Lipuro %1, B Braun, İstanbul), köpeklerde: 1 mg/kg Domitor ve 4-6 mg/kg Propofol veya 0,3 mg/kg Diazem (10 mg/2ml, Deva Holding A.Ş., Kocaeli), 0,2 mg/kg Butomidol (0.1mg/kg, Interhas, Ankara), 4-6 mg/kg Propofol veya 0,4 mg/kg Butomidol+ 4-6mg/kg Propofol kombinasyonları uygulandı. Kedi ve köpeklerin ağız bölgesinde yapılan muayenelerde mukoza, dişler ve diğer dokular, organlar sağlıklı görünse dahi mutlak olarak periodontal prob yardımı ile dişler en az 4 ve genel olarak 8 yerinden sondalandı (Şekil 3 ve Şekil 4).



Şekil 3. Köpeklerde periodontal cep derinliği ölçümünün yapılması (Siyah ok) (Olgu 138, Köpek, King Charles Cavalier, Dişi, 39 ay).



Şekil 4. Kedide periodontal cep derinliğinin ölçülmesi (Siyah ok) (Olgu 75, Kedi, ScottishFold, Erkek, 31 ay).

Radyolojik Muayene

Kedi ve köpeklerin ağız içi ve dişlerin radyografik muayenesinde (Aria 20, Hollanda) intra-oral, oblik, latero-lateral pozisyonlandırmada maksilla ve mandibula'daki dişlerin radyografileri alındı. Ayrıca küçük filmlili röntgen cihazında bu çalışmada kullanıldı (Trophy markalı ırx 70E modeli 2002, Fransa).

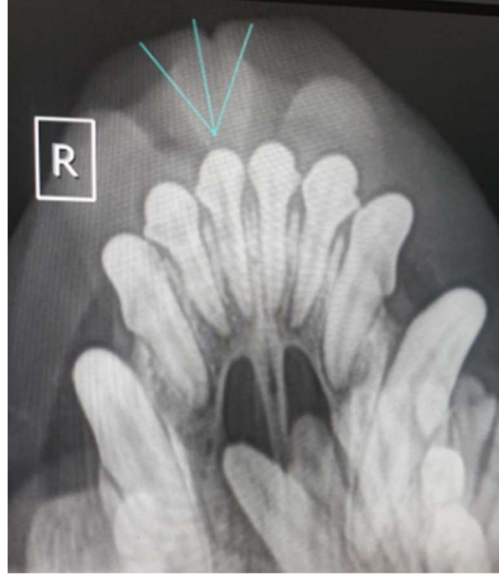
Pozisyon ve hastanın yerleşimini iyileştirmek üzere kum torbaları, v-şeklinde pozisyon destekleyicileri ve diğer araçlardan yararlanıldı. Görüntüsü alınacak diş 'yukarı' yönde gelecek şekilde pozisyonlandırıldı. Açıkların kolay belirlenmesi için, hastanın pozisyonları;

maksiller dişler-ventral yatış, mandibular premolar ve kesici dişler-dorsal yatış, mandibular premolar ve molar dişler etkilenen dişler üstte kalacak şekilde lateral yatış pozisyonuna getirildi.

Standart film kullanırken, filmin sağ tarafında kabartmalı bir noktanın bulunduğu tarafı projeksiyon tarafına doğru yerleştirildi. Film ağza tüm diş görüntülenecek şekilde yerleştirildi (Şekil 5 ve 6).



Şekil 5. Paralel teknik ile çekilmiş latero-lateral pozisyonlu kedi ağız röntgen görüntüsünde yatay kemik kaybı ve rezorpsiyon ok ile gösterilmiştir (Olgu 3: Kedi,Mix,Dişi, 33 ay).



Şekil 6. Paralel teknik ile çekilmiş ventro-dorsal pozisyonlandırılmış köpek ağızında pulpa ölümünde 101 nolu dişte gösterimdir. (Olgu 103: Köpek, Malta terrier, Erkek,10 ay)

Kedilerde Tedavi Yöntemleri

Periodontal hastalık 1. aşamada yakalandığında hasta sahibine plak kontrolünün önemi ve bunu nasıl yapacağı anlatıldı. Sedasyon altında manuel ve ultrasonik olarak detertraj işlemi uygulandı. Kedi periodontal hastalığın ikinci aşamasında yakalandığında ise sıklıkla gingival küretaj, detertraj ve gingivektomi işlemleri yapıldı. Bir sonraki aşama olan 3.evrede cerrahi girişim çok daha efektif uygulandı. Birinci ve 2.evredeki işlemlere ek olarak periodontal flep uygulaması yapıldı ve osteoplasti yönteminde kullanılabileceği bildirildi. Son evre olan 4. evrede yakalanan hasta grubu için en etkili yol enfeksiyon kaynağı olan diş bulundu ve bölgeden uzaklatırılıp sağlıklı yara dudakları karşı karşıya getirilerek dikildi.

Köpeklerde Tedavi Yöntemleri

Köpekler içinde birinci ve ikinci aşamada hasta sahiplerine kuru mamanın periodontal hastalığı önlemediği anlatıldı. Evde bakım için kullanılması gereken ürünler tanıtıldı. Sedasyon altında manuel ve ultrasonik detertraj işlemi uygulandı. Hastalığın ikinci aşamasında yakalanan köpeklere antibiyotikler önerildi. Üçüncü evrede ise cerrahi girişimde bulunuldu. Özellikle Mollozer köpekler (Bulldog, Pug, Fransız Mastiff, Fransız Bulldogv.b) de gingivektomi işlemi sıklıkla yapılarak periodontal cep derinliği fizyolojik sınırlara taşındı. Dördüncü evre tek tedavi yöntemi olarak diş çekimi uygulandı.

İstatistiksel Analiz

Değerlendirmeler için % ifadesi kullanıldı.

BULGULAR

Fiziksel Muayene Bulguları

Muayene edilen 150 kedi ve 150 köpeğin hasta sahipleri ile yapılan anket sonucunda; kedi sahiplerinin yalnızca 38 tanesinin (%25.3) diş fırçalaması gerektiğini bildiği, 11 tanesinin (%28.9) düzenli olarak diş fırçaladığı ve dişleri fırçalanan 11 kedinin 9 tanesinin (%81.8) herhangi bir ağız diş probleminin olmadığı not edilmiştir (Tablo 2). Aynı anket köpek sahipleri tarafından tamamlandığında 87 kişinin (%58) köpeğinin dişlerini fırçalaması gerektiğini bildiği 42 tanesinin (%48.2) dişlerini fırçalattığı ve 35 köpeğin (%40.2) de ağız diş problemi yaşamadığı ortaya çıkmıştır (Tablo 3).

Muayene edilen kedi ve köpeklerin cinsiyet dağılımı hastalığa yatkınlığı araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda 89 dişi (%59,3) kedi ve 61 erkek (%40,7) kedi muayene edilmiş; 89 dişi kedinin 71 (%79,7), 61 erkek kedinin ise 38 (%62,2) tanesinde 1 ya da daha fazla dişinde periodontal hastalık görülmüştür. Yetmiş iki dişi köpekten 65'i (%90,2), 78 erkek köpekten ise 28'i (%38,8) ağız diş sağlığı ile ilgili patolojiye sahiptir (Şekil 7,8,9).

Hasta sahipleri ile yapılan anket sonucunda köpek ve kedilerinin diş sayısını bilmedikleri dolayısı ile herhangi bir patolojiyi kolaylıkla fark edemedikleri görülmüştür. Ayrıca kedilerde diş fırçalama alışkanlığı ile ilgili anlamlı bir ırk yatkınlığı bulunamamıştır. Köpeklerde ise Pug cinsi köpeklerin bu alışkanlığı kazanmaya en uzak, Golden Retriever cinsi köpeklerin ise alışkanlığı kazanmaya en yakın ırk olduğu 150 kedi ve köpek için not edilmiştir (Tablo 2). Ayrıca kedi ve köpek sahiplerinin kuru mama tüketiminin diş taşıını önlediğini düşündüğü ve bu sebeple kuru mama tüketim miktarı yüksek oranda bulunmuştur.

Tablo 2. Hasta köpeklerin yaş ortalaması ve ırksal dağılımları gösterilmiştir.

Köpek ırkları	Ortalama yaş	PDH I. Evre	PDH II. Evre	PDH III. Evre	PDH IV. Evre	Toplam Sayı
Yorkshire	74 ay	3	3	7	5	18
Rottweiller	17 ay	2				2
Cocker	72 ay	6	5	4		15
Schnauzer	25 ay	1				1
Golden R	92 ay	4	2	1		7
Boxer	128 ay	1	3			4
Maltese	45 ay	4	7	5		16
Mix	77 ay	2	2			4
Kafkas Ç.	27 ay	1				1
KingChar.	42 ay	1	2	3	3	9
Jack Rus.	41 ay	1	2			3
Chihuahua	50 ay	2				2
Spitz	25 ay	1				1
CaneCorso	16 ay	2				3
Pomerian	32 ay	1	2	4		7

*PDH; Peridontal hastalık

Hasta kedilerin 33 tanesinde (%22) gingivo-stomatit (feline mukozit) görülmüş ve 11 tanesine (%7.3) hasta sahipleri ile ortak karar alarak total diş çekimi uygulandı.

109 hasta kedi (%72) içerisinde 33 adet (%22) feline mukozitli kedileri çıkarırsak geriye kalan 76 (%50) yangından ilk etkilenen dişlerin 108. ve 208. numaraları dişler olduğu ve tedavi edilmez ise yangının 107. ve 207. dişlere sıçradığı gözlemlendi.

Hasta kedilerde görülen ırk yatkınlıklarının dağılımı; 109 hasta kedi arasından Mıks-melez (Şekil 10) ve Scottish-British ırkı kedi sayısı 81'dir (%74,3). Köpeklerdeki ırk dağılımı ise King Charles, Cavalier, Pomerian, Yorkshire Terrier ırklarında periodontal hastalık görülme sıklığı %80 oranındadır ve 5 yaşını aşmış küçük ırk köpeklerin %67'sinin en az bir tane incisiv dişini kaybettiği not alınmıştır (Tablo 3).

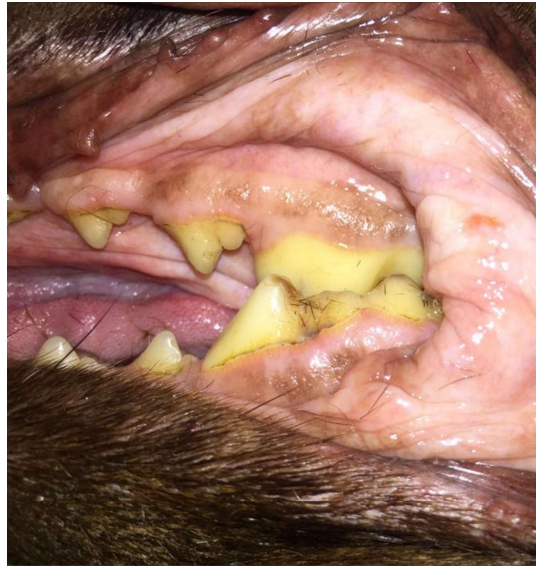
Tablo 3. Hasta kedilerin ortalama yaş ve ırk ayrımları gösterilmiştir.

Kedi Irkları	Scottishfold	British shorthair	Bir ma n	Sarma n	Van	Tekir	Mix	İran	Siyam
Ortalama yaş	15 ay	37 ay	54 ay	34 ay	43 ay	28 ay	81 ay	73 ay	39 ay
PDH I.Evre	12	7		7		3	8	1	1
PDH II. Evre	11	4	1	2		4	7		1
PDH III. Evre	3	4		2	2	4	4	2	2
PDH IV. Evre		2		4	2	3	1	2	5
Toplam sayı	24	17	1	15	4	14	20	5	9

*PDH; Peridontal hastalık



Şekil 7. Mine hipoplazisi kaynaklı başlayan periodontal hastalık (Siyah ok) (Olgu 81, Golden Retriever, Erkek 15 ay)



Şekil 8. Periodontal hastalık II evrede yabancı cisim birikimi sebebiyle tartar oluşumu ve gingivitis. (Olgu 59, Köpek, Labrador, Erkek, 25 ay).



Şekil 9. Periodontal hastalık IV. evrenin görünümü. (Olgu 77: Köpek Yorkshire Terrier, Dişi, 81 ay)



Şekil 10. Periodontal hastalık III. Evrenin ok yardımıyla gösterimi (Olgu 3: Kedi Mix, Dişi, 27 ay).

Radyolojik Muayene Bulguları

Olgulara radyolojik muayeneden önce sedasyon için Medetomidin hidroklorid (Domitor 1mg/ml, Pfizer, Finlandiya) uygulaması yapıldı. Sedasyon altındaki olguların açığortay tekniği ile mandibular ve maksillar

dişleri görüntülendi. Periodontal hastalık belirtisi olan dikey ve yatay kemik kaybı görülen olgular not edildi (Şekil 11,12).



Şekil 11. Perio-endo lezyon kaynaklı periodontal hastalık görünümü (Olgu 99: Köpek, Mıx, Dişi, 50 ay).



Şekil 12. Dikey kemik kaybı sebebiyle seyreden peridodontal hastalık görünümü (Olgu 51; Köpek, Mıx, Erkek, 39 ay).

Kedilerde Tedavi Yöntem Sonuçları

Kedilerin periodontal hastalığın çeşitli evrelerinde yapılan tedavilerin prognozları evde bakıma uyumlu olmadıkları için düşük görülmüştür. Çalışma sürecinde kediler için en başarılı tedavi yöntemleri arasında gingival küretaj, detertraj ve diş çekim gelmiştir. Bu olgularda başarı oranları yüksek bulunmuştur.

Köpeklerde Tedavi Yöntem Sonuçları

Köpeklerde gingival küretaj, detertraj ve diş çekimi sonuçları olumlu görülmüştür. Köpeklerde ise bunları yanı sıra periodontal flep ve gingivektomi işlemi evde koruma ile birlikte olumlu sonuçlar vermiştir. Birçok hasta sahibi kuru mama tüketiminin periodontal hastalığı tamamen önlediğini düşündüğü belirlenmiştir. Bu algı ve diş fırçalama teknikleri ile ilgili doğru bilgilendirilme sonucunda prognoz başarılı görülmüştür.

TARTIŞMA

Periodontal hastalık köpekleri etkileyen en yaygın hastalıkların başında gelir (Niemiec 2012) ve 3 yaş üstü köpeklerde %80-89 oranında bu problemin görüldüğü bildirilmiştir (Belows, 2019). Bu yüksek prevalansa rağmen, hastalığın genellikle teşhis edilmediği ve bu nedenle tedavi edilmediği düşünülmektedir. Periodontal hastalık sonunda diş kaybına neden olabilen yanksel, dişi destekleyici dokuların kaybı ile karakterizedir (Wiggs ve Lobprise 1997). Çalışmalar, hastalığın şiddeti ile yaş arasında pozitif bir ilişki olduğunu ve küçük boyutlu köpek ırklarında genellikle daha yaşlı ve büyük ırk köpeklere göre daha erken yaşta periodontal hastalık görüldüğü belirtilmiştir (Harvey ve ark 1994). Çalışmada 150 köpek periodontal hastalıklar yönünden değerlendirildi ve elde edilen bulgulara göre periodontal hastalıkların %80'i Yorkshire, Maltese, Cocker, King Charles gibi küçük ırk köpek ırklarında görülmüştür. Bunun da en önemli sebeplerinin başında bu ırkların küçük ağız yapısına rağmen fazla sayıdaki dişlerin olmasının sebep olduğu anlaşılmıştır. Buna bağlı olarak yiyecek parçacıklarının sıkışarak birikmesi ve bakterilerin üremesi için mükemmel bir ortam oluşmaktadır. Chihuahua ve Cocker gibi küçük ırkların dişlerinin fazla olması ve 42 dişinin bulunması, plak ve sonunda tartar birikimine neden olmaktadır. Süt dişlerinin düşmediği olgular da durum daha da kötüleşir. Aşırı dişler yüzünden gıdalar ağızda birikir ve bakterilerin birikmesine zemin hazırlar ve böylece periodontal hastalık oluşumuna neden olmaktadır. Pug'lar kısa burunları olan ve brakisefalik ırklar diş hastalıklarına daha duyarlı olduğu görülmüştür. Bu ırklar özellikle ağrı ve yangılara neden olabilecek uygun olmayan diş hizalanma sorunları yaşamaktadır. Çok sayıdaki dişler Pug gibi küçük ağızlarda da sorun yaratmaktadır. Aynı diş problemleri olan diğer brakisefalik ırklar arasında Bulldog, Shih Tzu, Lhasa Apsos ve Boston Terrier bulunmaktadır. Yorkshire'lar periodontal hastalığa yol açan plak ve tartar oluşumuna

eğilimli olduğu görüldü. Bu olgularda süt dişleri ile birlikte kalıcı dişleride sık sık ağızda birarada görülmektedir. Kalıcı dişler daha sonra bu dişlerin üstlerine gelir ve ciddi bir yangının oluşmasına neden oluşturmaktadır. Periodontal hastalık ve ağız kokusundan kurtulmak için süt dişleri ile birlikte kalıcı dişlerde ağızda ise süt dişleri derhal çekilmesi gereği önerilmiştir. Diğer çalışmaların çoğunda bildirildiği gibi periodontitis ve stomatit gibi ağız problemlerinin prevalansı yaşla birlikte artmaktadır. Periodontal hastalığın gelişimi ile ilgili birçok faktör bulunsa da teşvik edici etiyolojik ajan plak oluşumunu sağlayan bakterilerdir (Lindhe ve ark 1975, Bellow ve ark 2019). Araştırmalara göre, diş etlerinin bakteriyel biyofilmere maruz kalması sebebiyle yangı oluşur ve biyofilm oradan uzaklaştırılmazsa devam ettiği bildirilmiştir (Bellow ve ark 2019). Bu çalışmada küçük ırk köpeklerde sık görülmesi ırksal özelliğe bağlanabilir. Gengler ve ark (1995), rastgele seçilen 81 kedi de yapılan klinik radyografik olarak inceleme sonucunda 5 yaş üzerindeki kedilerin %50'den fazla periodontitis insidansı rapor etmişlerdir. Verhaert ve Van Wetter (2004) yılında yaptıkları çalışmada ise 7 yaş itibari ile kedilerin %40'ında periodontal hastalıkların arttığını belirtmişlerdir. Ayrıca ırklara göre yapılan değerlendirmede ise British Shorthair ve Scottishfold ırkı kedilerde genç yaşta diğer ırklardan daha fazla periodontal problemi olduğunu görmüşlerdir (Verhaert ve Van Wetter 2004). Çalışmamızda 5 yaş üzeri kedilerin %17,33'ünde periodontal problemler görüldü. Ayrıca Scottishfold ırkı kedilerde diş problemleri ortalama 1 yaş üzerinde %16 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar Verhaert ve Van Wetter (2004) yılında yaptıkları çalışma ile benzerlik göstermektedir. Konjenital ve gelişimsel problemler kedilerde sık görülmez. İran ve Shorthair kedilerde hastalık görülme sıklığı çok yüksek olan maloklüzyona bağlanmıştır. İran ve Shorthair kediler brakisefalik ırklardır ve yüksek maloklüzyon insidansına sahiptir. Brakisefalik kedilerde üst çene daha kısadır. Bu durum maloklüzyona sebep olabilir. Ayrıca Shorthair kedilerde problemlerin yüksek görülme oranı bu ırkların daha fazla sahiplenmesi ile ilgilidir (Clarke, 1999, Bellows ve ark. 2019). Sunulan çalışmada da British Shorthair ve Scottishfold ırkı kedilerde fazla görülmesi buna bağlanabilir. Ayrıca bu kedi ırklarının fiziksel sebeplerle evlerde daha fazla beslenmesi istatistiki artışı göstermektedir.

Günlük diş fırçalama, hem periodontal hastalığın oluşumunu hem de ilerlemesini önleyen altın standart olarak kabul edilmiştir (Gorrel ve ark. 2013, Harvey ve ark 2015). Bu nedenle, kedi ve köpek diş sağlığını iyileştirmek için en uygun tavsiye stratejileri için doğrulanmış yöntemler geliştirmek amacıyla kedi, köpek sahiplerinin evde diş bakımı ile ilgili bilgileri nasıl aldıklarını ve uyguladıklarını araştırma ihtiyacı duyulmuştur (Enlund ve ark 2019). Çalışmada 150 köpek ve 150 kedi sahipleri ile yapılan anket sonucunda; kedi sahiplerinin yalnızca 38 tanesinin (%25.3) diş fırçalaması gerektiğini bildiği, 11 tanesinin

(%28.9) düzenli olarak diş fırçaladığı ve dişleri fırçalanan 11 kedinin 9 tanesinin (%81.8) her hangi bir ağız diş probleminin olmadığı not edilmiştir. Aynı anket köpek sahipleri tarafından 87 kişinin (%58) köpeğinin dişlerini fırçalaması gerektiğini bildiği 42 tanesinin (%48.2) dişlerini fırçalattığı ve 35 köpeğin (%40.2) de ağız diş problemi yaşamadığını ortaya çıkarmıştır. Buna göre elde edilen sonuçlar tatmin edici olsa da özellikle anket çalışmalarında sorulacak soruların pet sahipleri tarafından açık bir şekilde anlaşılır olması ve çok sayıda pet sahiplerine ulaşması gerektiği düşünülmektedir. Ülkemizde yapılan araştırmalara bakıldığında pet sahiplerine yapılan ağız ve diş bakımı ile ilgili bir anket değerlendirmesi bulunmamıştır. Bu nedenle yapılan çalışmada toplam 300 kedi ve köpek sahiplerine ulaşılmış ve ağız ve diş bakımı hakkında anket değerlendirmesi önemli bulunmuştur. Kedi ve köpeğin dişlerinin fırçalanması periodontal hastalık görülme riskini azaltmıştır.

Sunulan çalışmada hasta kedilerin premolar ve molar dişleri (108, 208, 107 ve 207) anatomik yapı olarak daha büyük olması ve ağız boşluğu içinde gizlendiği için dil tarafından temizlenmesi zordur. Bu durum bakteri birikimini oluşturan ve hem plak hem de gingivitisin daha yüksek sayıda görülmesi yiyecek döküntülerinin birikimi ile açıklanmıştır. Premolar ve molar dişleri ayrıca çiğnemede baskın bir rol oynar ve bu dişlerdeki diastemata (dişlerdeki açıklık) insidansı, kesici dişlere göre daha yaygındır. Kesici dişler yüksek derecede aşınmaya bağlı plak oluşumları az görülür. Ayrıca, olguların beslenme durumlarında periodontal hastalık oranları arasında bağlantılar vardır (Vrieling ve ark 2005).

Oluşan plak, katı-kuru gıdanın fiziksel ve tesadüfi olarak kaldırılmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Clarke ve Cameron 1998). Ayrıca, kuru gıda, tükürük üretiminin artmasına sebep olabilir. Tükürüğün ağızda (Harley ve ark 2003) bulunan antijenlerle reaksiyona girerek üretilen immünoglobülinleri içerdiği iyi bilinmektedir ve bu nedenle, kuru gıda da ağız sağlığı sorunlarının önlenmesinde bağışıklık sisteminin daha iyi kullanılması sağlanacaktır. Kedi ve köpek sahiplerinin birçoğu kuru mamanın ağız sağlığı için yararlı olduğunu düşünmektedir. Fakat bu çalışmada kuru gıda ve yaş gıda ile beslemenin periodontal hastalıkların görülmesi arasında pozitif bir ilişki görülmemiştir.

Veteriner hekimlikte ağız ve diş sağlığı alanında ilerlemeye devam edildikçe, dental radyografinin hayati bir teşhis aracı olarak ihtiyacı ve kabulü artmıştır. Periodontal hastalıklar, kırık diş, diş rezorpsiyonu, neoplazi ve maksillofasial yaralanmaları değerlendirirken radyografi paha biçilmez bir görüntüleme aracıdır. Dental radyografi, sadece kedi pratiğinde değil, tüm küçük hayvan pratiğinde de paha biçilmez bir tanı yöntemidir. Dişin pulpa hastalıkları iyi kalitede intra oral radyograflar olmadan tam olarak değerlendirilemez ve teşhis edilemez. Dental radyograflar, diş rezorpsiyonunun erken tespitini daha olası kılar ve ekstraksiyonların cerrahi planlanmasına

yardımcı olur. Dental radyograflar, periodontal hastalıkları değerlendirirken kemik kaybı modellerinin belirlemede ve klinik bulguların diş rezorpsiyonu veya neoplazi gibi başka bir patolojik süreçten kaynaklanmamasını sağlamada önemlidir (Matthew 2013). Periodontal hastalığın değerlendirilmesinde radyograflar tek başına yeterli değildir, anamnez ve klinik muayene bulgularını (inspeksiyon, palpasyon, cep derinliği ölçümleri, gingival indeks, mobilité, yapışık diş etinin miktarı v.b) tamamlayıcı rol oynarlar. Periodontal hastalıkta radyografların bu avantajları, ancak uygun tekniğin seçimi, doğru uygulanması ve görüntü kalitesinin istenen düzeyde olması ile gerçekleşir. Sunulan çalışmada bazı olgularımızda yatay ve dikey kemik kaybı ve kök rezorpsiyonu ile seyreden periodontal hastalık gösterilmiştir.

Periodontal hastalığın sadece bir ağız hastalığı değil, sistemik sonuçları olacak bir hastalık olduğunu unutulmamalıdır. Periodontiti önlemenin veya azaltmanın tek yolu biyofilmi günlük olarak uzaklaştırmaktır. İyi bir ağız hijyeni ve diş bakımı elde etmek için veteriner hekimler, veteriner sağlık teknisyenleri ve kedi köpek sahiplerinin rolü büyüktür. Diş fırçalama, ağız ve diş bakım yönetiminde her zaman birinci sıra olarak önerilmelidir. Düzenli ağız ve diş muayenelerinde kedi ve köpek sahipleri ile veteriner hekimler uyum içerisinde olmalıdır. Genellikle diş fırçalamanın sağlanamadığı durumlarda hekimler hasta sahiplerine alternatif seçenekler sunmalıdır. Çünkü amaç sadece temiz dişler ile ilgili değildir aksine ciddi ve ağrılı sonuçları olan bir hastalığı önlemektir. Diş fırçalama kedi köpek sahipleri için zorlu bir süreçtir. Alternatif olarak klorheksidin içeren ağız içi sprey ve jeller geliştirilmiştir. Klorheksidin, plak birikimi ve dişeti iltihabının önlenmesi ve azaltılması için mevcut en etkili ajan olarak yerini almaktadır.

Veteriner hekimliğinin gelişimi, kedi ve köpek dişlerinde anormallikleri teşhis etme yeteneğini büyük ölçüde geliştirmiştir. Sonuç olarak, daha önce sadece insanlar üzerinde yapılan muayeneler artık küçük hayvanlar için mevcut olup, teşhis kalitesini arttırmaktadır. Bu, veteriner hekimlerin teknik niteliklerine duyulan ihtiyacı ve artan teknolojik yatırımları artırmıştır. Günümüzde en sık kullanılan görüntüleme yöntemlerinin başında radyografi gelmektedir. Özellikle ağız ve diş cerrahi sırasında hızlı sonuç verir ve düşük maliyete sahiptir. Teknolojik gelişmeler ilerledikçe bilgisayarlı tomografların kullanımında artacaktır.

Proje Destek Bilgileri : Nedime Atagür Selek'in Yüksek Lisans tez projesi S.Ü.BAP Koordinatörlüğünün 19202032 proje no ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri : Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) tarafından onay alındıktan sonra başlanmıştır (28.12.2018 tarihli, 2018/14 toplantı sayılı, 2018/185 nolu karar).

Çıkar Çatışması: Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Teşekkür: Petcode Hayvan Hastanesi sahibi Dr. Ateş Barut'a destek ve katkılarından dolayı teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

- Beckman BW.** Patient management for periodontal therapy. In: Niemiec B, ed. *Veterinary Periodontology*. Ames (IA): Wiley-Blackwell, 305–312, 2012.
- Bellows J, Berg ML, Dennis S, Harvey R, Lobprise HB, Snyder CJ, Stone AE, Van de Wetering AG,** 2019 AAHA Dental Care Guidelines for Dogs and Cats. *JAAHA*. 2019; 55,2.
- Bellows J.** Equipping the dental Practice. In: *Small Animal Dental Equipment*, 2004;13-55.
- Clarke DE.** The crystalline components of dental calculus in the domestic cat. *J Vet Dent*, 1999;16,4:165-168.
- Clarke DA.** Relationship between diet, dental calculus and periodontal disease in domestic and feral cats in Australia. *Aust. Vet. J.* 1998; 76, 690–693.
- Enlund, KB, Brunius, C, Hanson, J, Hagman R., Höglund OV, Gustas P, Pettersson A.** Development and validation of two questionnaires: Dental home care and dental health in Swedish dogs. *PLOS one* 2019; 14(1): 1-18.
- Feldman EC, Nelson RW.** Glucocorticoid therapy. In *canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 2004; 464-483.
- Gengler, WR, Dubielzig, R, Ramer J.** Physical Examination and Radiographic Analysis to Detect Dental and Mandibular Bone Resorption in Cats: A Study of 81 Cases from Necropsy 1995; 12, 3: 97-100.
- Gengler, WR, Kunkle, BN, Romano, D, Larsen, D.** Evaluation of a barrier dental sealant in dogs. *J Vet Dent*, 2005; 22. 3:157-159.
- Gorrel C, Andersson S, Verhaert L.** *Veterinary Dentistry for the General Practitioner 2nd Edition*. Journal of Elsevier. 2013.
- Harley R, Gruffydd-Jones T, Day M.** Salivary and serum immunoglobulin levels in cats with chronic gingivostomatitis. *Vet Rec*, 2003; 152: 125–129.
- Harvey CE.** Management of periodontal disease: understanding the options. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2005; 35(4): 819-836.
- Klokkevold PR, Takei HH, Carranza FA.** General principals of periodontalsurgery. In: *Carranza's Clinical Periodontology*, 2006; 887–901.
- Lindhe J, Hamp S, Løe H.** Plaque induced periodontal disease in beagle dogs: A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J Perio Res*, 1975;10: 243-255.
- Matthew L.** *Clinical Feline Dental Radiography*. *Vet Clin Small Anim*, 2013; 43,533–554.
- Merin RL.** Results of periodontal treatment. In: *Carranza's Clinical Periodontology*. St. Louis: Saunders, 2006, 1206-1214.
- Niemiec BA.** Periodontal disease. *Top Companion Anim Med*, 2008; 23,2: 72–80.
- Quirynen M, Vogels R, Peeters W, vanSteenberghe D, Naert I, Haffajee A.** Dynamics of initial subgingival colonization of 'pristine' peri-implantpockets. *Clin Oral Implants Res*, 2006; 17,1: 25-37.
- Verhaert, L, Wetter, C V.** Survey of Oral Diseases. In: *Cats In Flanders. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 2004; 73: 331-341.
- Vrieling H, Theyse L, van Winkelhoff A, Dijkshoorn N, Logan E, Picavet P.** Effectiveness of feeding large kibbles with mechanical cleaning properties in cats with gingivitis. *Tijdschr Diergeneeskd.* 2005; 130:136–140.
- Wiggs RB, Lobprise HB.** *Veterinary Dentistry principles and practice*, Lippincott-Raven, pp; 1997; 186-231.

Effect of Injectable Vitamin and Trace Element Administrations During Transition Period on Fertility in Brown Swiss Dairy Cows

Murat Onur YAZLIK^{1*}, Mehmet Rifat VURAL², Şükrü KÜPLÜLÜ³, Mert PEKCAN⁴

¹Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Obstetrics and Gynecology, 06110 Ankara, Turkey

²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Obstetrics and Gynecology, 06110 Ankara, Turkey

³Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Obstetrics and Gynecology, 06110 Ankara, Turkey

⁴Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine Department of Biochemistry, 06110 Ankara, Turkey

ABSTRACT

This study examined the effects of injectable vitamin and trace element combination during the transition period on clinical-biochemical parameters and reproductive performance in Brown Swiss dairy cows. Sixty multiparous cows were randomly allocated two groups as trace element-vitamin treated (n=30) and control (n=30). Animals received four injections at the beginning of the dry period, 21 days before parturition, the day of parturition, and postpartum 30±5 days. Energy, protein, hepatic metabolism markers, blood mineral levels concentrations were measured at -7±4 days antepartum, 3±2 days, and 30±5 days postpartum. Genital tract examinations were performed at 30±5 day postpartum. Treated cows showed lower glucose, total protein, urea, and greater NEFA concentration -7±4 days relative to calving. Effect of vitamin and trace element on serum calcium and phosphorus levels were significant. The total pregnancy rate was 95.8% and 59.09%, in treatment and control groups respectively at 150 days postpartum (P<0.05). In conclusion, trace element and vitamin supplementation increased pregnancy rate significantly and treatment positively affected energy, ion metabolism, and hepatic function.

Keywords: Vitamin and trace element, transition period, fertility

İsviçre Esmeri ineklerde geçiş döneminde vitamin, iz element uygulamalarının fertiliteye etkisinin araştırılması

ÖZ

Bu çalışmada geçiş dönemi boyunca vitamin ve iz element enjeksiyonlarının, klinik-biyokimyasal parametreler, periparturent dönem sorunları ile fertilitate parametrelerinin üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı. Altmış inek, iz element ve vitamin enjeksiyonu yapılanlar (n=30) ve kontrol grubu (n=30) olarak rastgele iki gruba ayrıldı. Vitamin ve iz element enjeksiyonları kuru döneme girişte, doğumdan 21 gün önce, doğumun gerçekleştiği gün ve doğumu izleyen (30±5). günlerde gerçekleştirildi. Enerji, protein, karaciğer metabolizması belirteçleri ile mineral düzeyleri doğum öncesi 7±4. gün, doğum sonrası 3±2. gün ve 30±5. günlerde ölçüldü. Genital organ muayeneleri doğum sonrası 30±5. günde gerçekleştirildi. Uygulama grubundaki inekler kontrol grubundakilere kıyasla doğum öncesi 7±4 günde daha düşük glikoz, toplam protein, üre ve daha yüksek NEFA konsantrasyonu gösterdi. Vitamin ve iz element uygulamasının serum kalsiyum ve fosfor düzeylerine etkisi önemli düzeydeydi. Doğum sonrası 150. günde toplam gebelik oranı uygulama ve kontrol gruplarında sırasıyla % 95.8 ve % 59.09 olarak saptandı (P<0.05). Sonuç olarak, iz element ve vitamin uygulanan ineklerde toplam gebelik oranının belirgin olarak arttığı ve uygulamaların enerji, iyon metabolizması ve karaciğer fonksiyonlarını olumlu etkilediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Vitamin ve iz element, geçiş dönemi, fertilitate

To cite this article: Yazlık M.O, Vural M.R, Küplülü Ş, Pekcan M. Effect of Injectable Vitamin and Trace Element Administrations During Transition Period on Fertility in Brown Swiss Dairy Cows. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):113-122

Submission: 09.01.2021 Accepted: 26.02.2021 Published Online: 26.02.2021

ORCID ID; MOY: 0000-0002-0039-5597 MRV: 0000-0001-7252-7977 ŞK: 0000-0001-7488-9736 MP: 0000-0003-3084-125X

*Corresponding author e-mail: yazlik@ankara.edu.tr

INTRODUCTION

The transition period is defined as three weeks before and after parturition and the most challenging dairy cows' lactation duration. Metabolic, hormonal and immunologic alterations are the characteristic of this period (Bell 1995). During the transition period animals are susceptible to metabolic and infectious disorders due to increased demand for energy and minerals (Drackley et al. 2005, Sordillo and Aitken 2009). As a response to energy deficiency, dairy cows mobilize their body reserves (Drackley et al. 2001). Consequently, non-esterified fatty acids (NEFAs) and beta-hydroxybutyric acid (BHB) concentrations increase in blood during the transition period. Subsequently, dry matter intake and calcium ion concentration decrease which increased cortisol concentration. The high concentration of fatty acids, ketone bodies, cortisol and decreased calcium levels impairs immune response (Scalia et al. 2006, Contreras et al. 2010). Increased metabolic demands, parturition and metabolic stress alter the oxidant and antioxidant balance leading to oxidative stress (Sordillo and Aitken 2009). Oxidative stress and negative energy balance, lead to trace element and vitamin deficiencies (Hayırlı et al. 2002, Machado et al. 2013). An injectable form of trace elements and vitamins provides an alternative way of delivering extra trace elements and vitamins during the transition period. And leads an increase in tissues within several hours or days (Pogge et al. 2012). Trace elements or vitamin supplementation during the transition period minimize the stillbirth risk, retained placenta, uterus infections and mastitis. Furthermore, it increases fertility (Politis, 2012, Machado et al. 2013, Pontes et al. 2015). At the same time, they had no adverse effect on hematologic and immune parameters (Bicalho et al. 2014, Schäfers et al. 2018).

Due to the decrease of dry matter intake, an increase of growing fetus requirement and beginning of colostrogenesis and lactogenesis process resulted with trace element and vitamin insufficiency. The farming systems changed over the last few decades; thus intensive cattle breeding resulted in nutrient losses of feed due to storage problems (Tilman et al. 2002). On the other hand, trace elements associated with fiber fractions in the feedstuff and/or binding of undigested fiber to the trace minerals decreases the bioavailability. Due to immune response and oxidative status of cows altered during the transition period, the incidence of puerperal disorders increases (Sundrum 2015). The process of follicular development from the primordial pool takes 4 to 5 months to reach the ovulation phase in dairy cows (Webb et al. 2003); thus follicular growth starts from the late stage of gestation, the increased demand of trace element and vitamins might mitigate

the follicular growth or oocyte quality. It was aimed to investigate the effects of vitamin, trace element, and mineral supplementation during the dry and transition period on clinical-biochemical parameters, periparturient problems, and fertility.

MATERIALS and METHODS

All experiments on animals were carried out according to the standards approved by the Animal Welfare and Research Ethics Committee at Ankara University (2015-12-139).

Animals and Housing

This study was conducted on a farm incorporated in the Directorate General of Agricultural Enterprises in Turkey. Cows were monitored from the beginning of dry period (-60 d) until five months postpartum (150 d) for the determination of any puerperal disorders and calving as well as postpartum diseases. Serological controls (brucellosis, tuberculosis, neosporosis) and vaccinations (Bovine Herpesvirus-1, Bovine viral diarrhea virus, coronavirus, rotavirus) were performed regularly. The barns were naturally ventilated and artificially lighting. According to NRC recommendations, cows were fed total mixed rations (TMRs) ad libitum (09.00, 16.00 and 00.00 h) to meet their nutrient requirements (NRC 2001). The composition of the TMR was shown in Table 1. TMR was prepared daily by vertical mixer feeder and offered three times with diet portions equally split between three feedings.

Experimental Design and Treatments

A total of 60 pregnant multiparous Brown Swiss dairy cows between 2 to 4 lactations were enrolled in the study. Animals were randomly divided into two groups as treatment (n=30) and control (n=30) at the beginning of the dry period. Cows were randomized using the random number function in Microsoft Excel (Redmond, WA, USA) and imported into the farm's Dairy Plan (GEA®, Germany). Cows that assigned to treatment groups received four injections of trace element (Activate, Alke®, Turkey, 8 ml) and vitamin (Ademin®, Ceva, France, 10 ml) combination at 230 and 260±5 days of pregnancy, around parturition and 30±5 days in milk (DIM). Each trace mineral injection contains 2.5 mg Cu, 1.25 mg Se, 5 mg Mn and 5 mg Zn per ml. Each vitamin injection contains 500000 IU vitamin A, 75000 IU vitamin D3 and 50 mg vitamin E per ml. The control groups received 0.9% isotonic sodium chloride (NaCl) with the same volume. For the first three days following the parturition the treatment and control animals received calcium and phosphorus solutions parenterally.

Table 1. Integrant of diets fed during far-off (-60 to -31 d relative to expected calving), close-up (-30 d to calving), and early lactation.

Component	Far-off	Close-up	Early Lactation
Ingredient. % of DM			
Vetch hay	11.58	-	-
Alfalfa silage	-	-	9.67
Alfalfa hay	7.89	6.97	10.29
Corn silage	52.6	43.51	44.16
Wheat straw	10.52	22.25	-
Soybean meal. 48% CP	-	-	1.61
Concentrated feed	15.78	20.94	30.31
Limestone	0.82	2.25	1.57
Salt	0.30	-	0.26
Ammonium chloride	-	1.15	-
Dicalcium phosphate	0.14	0.3	0.44
Magnesium oxide	-	0.12	0.44
Magnesium sulphate	0.16	1.35	0.25
Sodium bicarbonate	-	-	0.7
Calcium sulphate	-	-	0.1
Mineral-vitamin mix ¹	0.21	0.17	0.2

¹Contained a minimum of 4.3%Mg, 8% S, 6.1% K, 2.0% Fe, 3.0% Zn, 3.0% Mn, 5000 mg/kg Cu, 250 mg/kg of I, 40 mg/kg of Co, 150 mg/kg Se, 2200 kIU/kg of vitamin A, 660kIU/ kg of vitamin D3, and 7700 IU/kg of vitamin E.

Blood Sampling and Metabolite, Ion Analyses

Blood samples were collected before the morning feeding on the coccygeal artery or vein into Vacutainer tubes without anticoagulant (Hema&Tube®) using 20gauge × 2.54 cm Vacutainer needle (Vacutainer, Becton, Dickenson and Company) at 7±4 days before the expected calving date, 3±2 and 30±5 days postpartum. Samples were clotted and then placed on ice until processing. Blood samples delivered to the farm laboratory under the cold chain then were centrifuged at 1300xg, +4°C for 10 minutes in the first 15-60 minutes after collection. The serum was separated and collected into 1,5 ml tubes containing information such as ear number, administration group, blood collection date, and stored in a freezer at -20°C in the farm laboratory (Little et al. 2017). At the end of the study the serum samples placed on the ice molds in the biological sample carrying bag were delivered to the Biochemistry Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University. Serum samples were analyzed for the determination the concentration of NEFA, BHB, glutamate dehydrogenase (GLDH), glucose, albumin, total protein, urea, creatine kinase (CK), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), gamma glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase (LDH), cholesterol, triglyceride, total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg), potassium

(K), sodium (Na), chlorine (Cl) in blood serum (Hoedemaker et al. 2004) by using commercial kits

following manufacturer instructions with auto analyzer (ERBA XL 600®) equipped with spectrophotometric and ion-selective electrode (ISE) in Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Diagnostic Laboratory. All analyses were calibrated using ERBA XL Multical® and calibration verified using two control serum (ERBA Norm® and ERBA PATH®). GLDH levels of serum samples were determined by a 96-well microplate reader device (Sunrise®, Tecan, Switzerland) with a Magellan TM data analysis software with a spectral wave range of 400-750 nm.

Reference Blood Values

The physiological upper limit for NEFA 0.3 mEq/L in the prepartum period and 0.7 mEq/L postpartum were proposed by McArt et al. (2012). The reference concentration level for BHB was below 1200 mmol/L postpartum (Ospina et al. 2010). According to Goff (2014), blood serum total Ca concentration 8.5 mg/dl and below were defined as subclinical hypocalcaemia. The physiological limit of phosphorus concentration was accepted as 4-8 mg/dl (NRC, 2001).

Body Condition Score

The animals' body condition scores were determined on the start of the dry period and days of blood collection as previously described by Ferguson et al. (1994).

Parturition and Maternity Pen

The normal-stillbirth and the sex of calf and dystocia score were recorded by using the system as previously described by Heins et al. (2006). During the postpartum period, body temperature, appetite and rumen fullness were examined and recorded twice a day for five days.

Postpartum vagina, uterus and ovary examination

Postpartum genital tract examination performed on 30±5 d postpartum. The vaginal examination was performed by hand for the purpose of evaluating the vaginal discharge scoring. Before the examination, the vulva was cleaned by a paper towel. A gloved and lubricated hand inserted to the vagina. Discharges in the anterior vagina accumulated (Little et al. 2017). Vaginal discharges scored by using the system Williams et al. (2005). Animals with mucopurulent, purulent or malodorous discharge at the time of examination were diagnosed with clinical endometritis. The transrectal ultrasonography examination of the ovaries was performed using a linear probe with a frequency of 6.5-9 MHz (SIUI®, CTS 800, China). The presence of follicles with a diameter of less than 20 mm and greater than 9 mm on the ovaries were detected and the measurements were recorded (Tanaka et al. 2008). In the absence of corpus luteum in the ultrasonography examination of ovaries, the structures with dimensions of 2.5 cm or more were considered ovarian cyst (Silvia et al. 2005). The presence of corpus luteum was also investigated. Animals that had a corpus luteum recorded as cyclic. Animals with corpus luteum were treated with PGF2α (Enzoprost-T®, CEVA, France) containing 25 mg of dinoprost. animals that did not consist a corpus luteum treated with GnRH (Ovarelin®, CEVA, France) containing 100 mcg of Gonadorelin diacetate tetrahydrate. Animals clinical endometritis were treated with the unique intrauterine treatment protocol as determined by the General Directorate of Agricultural Enterprises and other parenteral treatment protocols.

Fertility Parameters

The oestrus symptoms were detected visually by experienced farm personnel from the 50th day of the postpartum. All animals were examined before the inseminations. Each cow was inseminated until 150 days postpartum. Transrectal ultrasonography examinations were performed to determine whether the pregnant or non-pregnant animals at 30±2 days post insemination. After the inseminations, pregnancy rates, total pregnancy rates, the number of insemination, and calving to pregnancy interval were evaluated (Hoedemaker et al. 2009).

Statistical Analysis

Before performing the statistical analysis, data were examined with the Shapiro-Wilk test for normality and

Levene test for homogeneity of variances as parametric test assumptions. Descriptive statistics for each variable were calculated and presented as "mean ± standard error of the mean". Chi-square test was used to determine the difference between treatment and control groups following measures, presence of corpus luteum, pregnancy rates, and uterus infection. The difference between calving to first AI, calving to conception interval, number of inseminations and lactations parameters, Mann-Whitney U test was performed.

The effect of group, day of sampling and their interaction on NEFA, BHB, GLDH, glucose, albumin, total protein, urea, CK, ALT, ALP, AST, GGT, LDH, cholesterol, triglyceride, TBIL, DBIL, Ca, P, Mg, K, Na, and Cl were analyzed using MIXED procedure of SPSS (V22.0; SPSS Inc. Chicago, IL, USA), the following model with repeated measures

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + Z_j + (G \times Z)_{ij} + e_{ijk}$$

Where Y_{ijk} was the dependent variable, μ was the overall mean, G_i was the effect of the group ($i = \text{Treatment and control}$), Z_j was the effect of day of sampling ($j = -7 \pm 4, 3 \pm 2, \text{ and } 30 \pm 5 \text{ d}$), $(G \times Z)_{ij}$ represented interaction between group i and day of sampling j , and e_{ijk} was the residual error.

Animals within the group were assessed as a random effect, while group, period, or day of sampling and their interaction were assessed as a fixed effect. $P < 0.05$ was considered significant in all analyses. When a significant difference was revealed, any significant terms were compared by simple effect analysis with Bonferroni adjustment.

RESULTS

Six animals from the treatment and eight animals from the control group were excluded from the study as per management policies. There was no significant difference between mean lactation numbers among groups. Trace element and vitamin supplementation did not affect BCS in cows. The BCS was influenced by time only, showing a drop toward 30±5 DIM.

Postpartum Period and Fertility Parameters

Body temperature and time of rumination in 5 days postpartum were similar in both groups. The number of cases for retained placenta were not affected by treatment. Treatment did not affect on the incidence of clinical endometritis. The 66.6% of cows were considered cyclic at 30±5 DIM. There was no effect of treatment on cyclicity ($P > 0.05$). Also, treated cows showed similar calving to conception interval, calving to first AI interval compared to control cows. Additionally, the number of inseminations were similar among groups. The pregnancy rate at first and third service did not differ between treatment and control cows. However, the odds of second insemination and total pregnancy were greater in the treatment group

than the control group at 150 days postpartum (P<0.05, Table 2).

Energy and Protein Metabolism Markers

The main treatment and interactive effects on blood energy and protein biomarkers are presented in Table 3. Supplementation with trace elements and vitamins did not affect the serum concentration of BHB (P>0.05). NEFA, glucose, total protein, albumin, and urea concentration changed over time. Also, these parameters affected by the interaction between treatment and time. The glucose concentration showed most significant decrease around parturition in control cows (P<0.05). NEFA concentration was greater however, serum glucose, total protein, albumin and urea concentration were lower in the treatment group at prepartum period (P<0.05). Treated cows had increased urea levels after parturition compared to the levels at pre-calving sampling levels and showed similar urea concentrations during the postpartum period. The total proteins marginally decreased in control cows in the early postpartum period (P<0.05). Although treated cows showed greater NEFA, glucose and urea concentrations, they did not reach the pathological threshold levels after parturition (Table 3).

Enzyme and Liver Function Markers

GLDH, AST, LDH, cholesterol, BIT and BID concentration changed over time significantly (P<0.05). There was only an interaction noted between time and treatment for ALT and cholesterol levels. Prepartum decreased ALT concentration was shown in the treatment group (P<0.05). Cholesterol concentration decreased in the treatment group at 30±5 days postpartum (Table 3).

Mineral Concentrations

All mineral panel parameters changed over time, but, there was only interaction between treatment and time for calcium and phosphorus concentration. Chlorine, sodium, potassium and magnesium concentrations were similar among groups. Prepartum calcium and phosphorus concentration were lower in the treatment group (P<0.05). Mean calcium concentration was in subclinical hypocalcaemia levels in control cows after parturition (Table 3). Treatment with trace elements and vitamins during the transition period did not affect pre-postpartum Mg, Na, K, Cl levels.

Table 2. Findings of genital tract examination on 30±5 days postpartum and fertility parameters.

Items	Animals		P
	Treatment (n=24)	Control (n=22)	
Clinical Endometritis	10/24	6/22	0.210
Presence of CL	16/24	10/22	0.092
Ovarian Cyst	1/24	1/22	-
Number of animals that have follicle within 12-20 mm in the absence of CL	4/24	7/22	-
Calving to first AI interval (days) ($\bar{x}\pm$ SEM)	91.84±9.65	105.48±7.40	0.300
Calving to conception interval (days) ($\bar{x}\pm$ SEM)	121.69±13.28	111.27±11.7	0.527
Number of inseminations ($\bar{x}\pm$ SEM)	1.65±0.15	1.87±0.19	0.564
Pregnancy rate after 1st AI (%)	41.18	28	0.374
Pregnancy rate after 2nd AI (%)	80 ^{B,a}	21.43 ^A	0.005
Pregnancy rate after 3rd AI (%)	100	83.33	0.659
Total pregnancy rate (%)	95.8 ^{B,a}	59.09 ^A	0.003

Means within a row (a-c) and column (A-B) with differ superscript letters differ significantly (P<0.05).

Treatment: Cows supplemented with trace element and Vitamin Combination

Control: Control group

(\bar{x}): Average

SEM: Standart Error Mean

CL= Corpus Luteum

Table 3. The effect of trace element and vitamin treatment on blood serum metabolites during the pre- post-partum period ($\bar{x}\pm$ SEM).

	Prepartum		Postpartum		P	
	-7±4 d	3±2 d	30±5 d	Treatment	Time	Treatment*Time
Energy and Protein Metabolism Markers						
NEFA (mEq/L)						
Treatment	0.48 ± 0.11 ^{ab, A}	0.58 ± 0.05 ^{a, A}	0.30 ± 0.03 ^b	0.000	0.004	0.007
Control	0.11 ± 0.003 ^{b, B}	0.32 ± 0.04 ^{a, B}	0.27 ± 0.03 ^{ab}			
Urea (mg/dl)						
Treatment	24.99±1.30 ^{b, B}	37.88±3.34 ^{a, A}	32.60±3.26 ^a	0.476	0.008	0.010
Control	29.26±1.34 ^A	29.18±2.66 ^B	31.37±1.79			
Glucose (mg/dl)						
Treatment	60.17±1.65 ^B	61.96±3.20 ^A	57.13±2.29	0.740	0.014	0.005
Control	67.69±1.71 ^{a, A}	52.44±2.78 ^{b, B}	57.44±2.25 ^b			
T. Protein (g/dl)						
Treatment	6.38 ± 0.18 ^{b, B}	6.68 ± 0.17 ^{ab}	7.31 ± 0.26 ^a	0.121	0.000	0.001
Control	7.61 ± 0.14 ^{a, A}	6.27 ± 0.29 ^b	7.48 ± 0.25 ^a			
Albumin (g/dl)						
Treatment	3.19 ± 0.06 ^b	3.47 ± 0.06 ^a	2.95 ± 0.08 ^{b, B}	0.369	0.003	0.003
Control	3.35 ± 0.07	3.24 ± 0.1	3.23 ± 0.09 ^A			
Enzymes and Hepatic Function Markers						
ALT (IU/L)						
Treatment	19.70±1.04 ^B	20.53±1.23	21.90±1.67	0.139	0.077	0.003
Control	27.08±2.23 ^{a, A}	20.63±1.35 ^b	21.40±1.06 ^b			
Cholesterol (mg/dl)						
Treatment	84.17±4.23 ^b	76.38±4.93 ^b	104.54±6.32 ^{a, B}	0.267	0.000	0.000
Control	82.85±3.38 ^b	64.85±4.86 ^c	136.35±7.43 ^{a, A}			
Minerals						
Ca (mg/dl)						
Treatment	8.20 ± 0.21 ^{b, B}	8.54 ± 0.21 ^{ab}	9.16 ± 0.13 ^a	0.073	0.000	0.000
Control	9.93 ± 0.09 ^{a, A}	8.07 ± 0.33 ^c	8.92 ± 0.20 ^b			
P (mg/dl)						
Treatment	6.08±0.20 ^B	5.88±0.27 ^A	6.70±0.49	0.714	0.000	0.005
Control	7.12±0.21 ^{a, A}	4.50±0.22 ^{b, B}	6.67±0.60 ^a			

Means within a row (a-c) and column (A-B) with differ superscript letters differ significantly (P<0.05).

Treatment: Cows supplemented with trace element and Vitamin Combination

Control: Control group

(\bar{x}): Average

SEM: Standart Error Mean

DISCUSSION

This study evaluated the effect of injecting a trace mineral and vitamin complex during the transition period on reproductive outcomes and serum metabolite and ion concentrations in multiparous Brown Swiss cows. We hypothesized that trace element and vitamin injections at the beginning of the dry period, during the last three weeks of gestation, after parturition and 30±5 days postpartum would increase the reproductive parameters. When considering all cows' data, pregnancy rates at first or third services did not differ between treatments. However, the second service pregnancy rate and odds of total pregnancy were greater in the treatment group than in the control. The literature review showed

inconsistent results regarding the role of trace mineral and vitamin injections on fertility. Campbell et al. (1999) showed that trace element administration positively impacted fertility by decreasing calving to first oestrus interval. Griffiths et al. (2007) and Pontes et al. (2015) also reported that vitamin administrations increased pregnancy rate in dairy cows. As well as trace element injections increased the success rate of embryo transfer studies (Sales et al. 2011). However, Machado et al. (2013) and Bach et al. (2015) did not find any positive effect of trace element supplementation on fertility. Furthermore, the trace mineral supplementation increased the risk of metritis (Machado et al. 2013). Additionally, Bach et al. (2015) stated that the exact mechanism by which trace elements affect reproduction is unknown. There are

several theories exist on how the trace element and vitamin affect reproductive parameters. Trace elements and vitamins have a role in enzymatic and metabolic pathways that interact with steroidogenesis, small follicle cell proliferation, and embryo development (Griffiths et al. 2007, Faes et al. 2009). The period from the primordial follicle pool to the selection and ovulation of the follicles is approximately 4-5 months (Webb et al. 2003). The higher total pregnancy rate in the treatment group may have increased the quality of follicle and oocyte developing from the primordial follicle pool by trace element and vitamin applications since the beginning of the dry period, and thus higher pregnancy may be achieved. Besides, trace element supplementation decreases the number of bacteria species in the microbiota of early postpartum uterus. Trace elements and vitamin administrations influence innate and humoral immune systems; thus, uterine health might be protected at the molecular level.

On the other hand, those compounds are assigned on the antioxidant system, thereby the negative effect of reactive oxygen species which produced by immune and somatic cells might be prevented on follicle as well as testis level (Wintergerst et al. 2007, Tafuri et al. 2015). Galvão et al. (2010) detected a greater negative energy balance in cows with endometritis. Bicalho et al. (2014) reported that endometritic cows had lower blood calcium level. These findings coincided with the present study and NEFA concentration was greater, with decreased Ca concentration in the treatment group at the prepartum period. Numerical differences may be observed due to metabolic inflammation, which resulted from an increase in NEFA concentration at the prepartum period.

Body condition score is a simple method to assess the energy status in dairy cows. Because there is a strong relationship between BCS and energy balance. There is evidence that trace element supplementation does not impact BCS (Sales et al. 2011, Bicalho et al. 2014, Machado et al. 2014). Similarly, in our study, trace element and vitamin administration did not affect the BCS. Colostragenesis, accelerated foetal growth, hormonal disturbances, parturition and beginning of lactation during the transition period resulted in increased metabolic demands. Furthermore, these physiological changes decreased dry matter intake and resulted in negative energy balance. As a result of negative energy balance, gluconeogenesis and lipomobilization rate alters. This change triggers the severity of negative energy balance (Joksimović Todorović and Davidović 2012). Even so, trace element and vitamin concentration did not affect glucose concentration (Avcı and Kızıl 2013), manganese had a negative role on carbohydrate metabolism (Ömür et al. 2016), thus supplementation might decrease the prepartum glucose concentration. However, the glucose concentration increased after parturition in treated cows and was greater. This result consistent with Nayyar et al. (2003). The possible

mechanism of the increase in glucose concentration might be the influence of treatment. Because selenium shows insulin-like activity, it had a role in glycolysis and gluconeogenesis pathways (Stapleton 2000).

The increased concentration of NEFA during the prepartum period ($\geq 0,4$ mEq/L) is a risk factor for retained placenta, metritis and ketosis (LeBlanc 2006). González et al. (2011) reported that postpartum NEFA concentration had no relationship with subclinical ketosis, mostly it is related to postpartum lipomobilization. The present study showed that trace element and vitamin treatment might increase the severity of lipomobilization at prepartum period. However, NEFA concentration was in physiological level in both groups at the postpartum period. Notwithstanding, treated cows had higher prepartum NEFA concentration, both groups had similar metabolic and infectious problems. Thus, trace element and vitamin injection during the transition period might suppress the negative effect of prepartum lipomobilization and decrease the incidence of peripartum problems. NEFA is converted to BHB by the liver and used by brain, heart, liver, and mammary glands in ruminants (Drackley and Andersen 2006). Machado et al. (2013) reported that trace element injections during the transition period decreased BHB concentration. However, in the present study, BHB concentration was not affected by treatment. The possible difference might be the weak correlation between NEFA and BHB (Cavestany et al. 2005).

The role of cholesterol on ruminant energy metabolism unknown exactly. In one theory, increased concentration of cholesterol better for energy balance, on the other hand, Bruss et al. (1997) reported that increased cholesterol results from energy deficiency in dairy cows. Chandra et al. (2018) observed increased cholesterol concentration after trace element and vitamin supplementation, similar to the present study.

Urea concentration directly related to hepatic function and composition of ration (Strang et al. 1998). In comparison with Chandra et al. (2018), the urea concentration was increased after parturition in treated cows. This changes possibly related to prepartum increased NEFA and decreased glucose concentration, resulting in the usage of protein reserves in the body and increased urea concentration. Also, ration composition changes affect the urea concentration, but the same ration is offered to the control and treatment groups. A similar mechanism might be effective for decreased total protein concentration in the prepartum period. We observed an increase in total protein and albumin concentration after parturition in treated cows while it remained similar or showed a decrease in control cows. Hence, similar to Ömür et al. (2016), trace element and vitamin combination had a positive role in protein metabolism.

Liver enzymes activities and hepatic function markers help determine liver status in transition cows (Bertoni and Trevisi 2013). Like Schäfers et al. (2018) AST, GGT, GLDH concentrations were in

physiological ranges in treatment and control groups. Moreover, increased NEFA concentration negatively affects hepatic function markers, but in the present study, liver enzymes were not affected (within the reference ranges) by greater NEFA concentration. Thus, possibly, trace element and vitamin combination might suppress the negative effect of increased NEFA concentration.

Calcium is an ion that direct relationship with immune parameters and muscle cell functions. It might be a marker for determining immune cell functions during the transition period (Martinez et al. 2012). Decreased calcium concentration increase the cortisol level and chemotactic and bactericidal activities of immune cells are suppressed (Salak-Johnson and McGlone 2007). Also, cytosolic Ca²⁺ concentration affected by total calcium levels. Cytosolic Ca²⁺ has no direct relation with phagocytosis; it has a role at the beginning of the activity (Sayeed 2000). With decreased glucose and increased NEFA, the level of low calcium might be the result of depression of dry matter intake. Adipocytes stimulated by calcium-sensitive receptor agonists decrease the basal lipolysis; however, excessive lipolysis decreases the calcium level (Cifuentes et al. 2005). Another role of calcium is in energy metabolism as a seconder messenger. Thus, directly affect the cycle of tricarboxylic acid. The decrease in calcium concentration resulted in alteration in carbohydrate metabolism and tricarboxylic acid cycle, which resulted in severe negative energy balance (Chamberlin et al. 2013). We considered that trace element and vitamin supplementation and calcium and phosphorus injection after parturition might suppress the severity of negative energy balance.

CONCLUSION

The present study showed that cows injected with trace element and vitamin supplementation at 230 or 260 days of gestation, around parturition and 30±5 days postpartum had greater odds of becoming pregnant than control cows. Combined injectable trace elements and vitamins increase the quality of inseminable follicles leading to ovulation in the postpartum period. Also, trace element and vitamin administration positively affect energy, hepatic and ion metabolism. However, the exact mechanism by which trace elements and vitamins affect bovine fertility requires further research.

Explanation: This article was produced from the first author's PhD dissertation entitled 'Effect of injectable vitamin and trace element administrations during transition period on fertility in Brown Swiss dairy cows'. This work was done under the project entitled 'The effect of injectable trace minerals and vitamins on neutrophil leucocyte activity and fertility in Brown Swiss cows and heifers' supported by the Ankara University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number:16B0239001), Ankara, Turkey.

Thanks: The authors are grateful to Ufuk Kaya and Pınar Ambarcıoğlu for their kind assistance.

Ethics Committee Information: This study was approved by Ankara University HADYEK number 2015-12-139 in accordance with the "Regulation on the Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees". In addition, the authors have declared that Research and Publication Ethics are observed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the Ankara University Institutional Animal Ethics Committee (2015-12-139).

Conflict of interest: The authors declare that there is no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

REFERENCES

- Avcı C, Kızıl O.** The effects of injectable trace elements on metabolic parameters in transition cow. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2013; 19: 73-78.
- Bach, A, Pinto A, Blanch M.** Association between chelated trace mineral supplementation and milk yield, reproductive performance, and lameness in dairy cattle. *Livest Sci.* 2015; 182: 69-75.
- Bell AW.** Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *J Anim Sci.* 1995; 73: 2804-2819.
- Bertoni G, Trevisi E.** Use of the liver activity index and other metabolic variables in the assessment of metabolic health in dairy herds. *Vet Clin North Am Food Anim Prac.* 2013; 29: 413-431.
- Bicalho MLS, Lima FS, Ganda EK, Foditsch C, Meira EBS, Machado VS, Bicalho RC.** Effect of trace mineral supplementation on selected minerals, energy metabolites, oxidative stress, and immune parameters and its association with uterine diseases in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2014; 97, 4281-4295.
- Bruss ML.** Lipids and ketones, In: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, Ed; Kaneko J, Harvey JW, Bruss ML, 6th Ed., Academic Press, New York, USA. 1997; pp.86–105.
- Campbell MH, Miller JK, Schrick FN.** Effect of additional cobalt, copper, manganese, and zinc on reproduction and milk yield of lactating dairy cows receiving bovine somatotropin. *J Dairy Sci.* 1999;82:1019-1025.
- Cavestany D, Blanch JE, Kulcsar M, Uriarte G, Chilbroste P, Meikle A, Febel H, Ferraris A, Krall E.** Studies of the transition cow under a pasture-based milk production system metabolic profiles. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2005; 52:1–7.
- Chamberlin WG, Middleton JR, Spain JN, Johnson GC, Eilersieck MR, Pithua P.** Subclinical hypocalcemia, plasma biochemical parameters, lipid metabolism, postpartum disease, and fertility in postparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 2013; 96:7001-7013.
- Chandra G, Aggarwal A, Kumar M, Singh AK.** Effect of zinc and vitamin E supplementation on hormones and blood biochemicals in peri-partum Sahiwal cows. *J Trace Elem Med Biol.* 2018; 50:489-497.

- Cifuentes M, Albala C, Rojas C.** Calcium-sensing receptor expression in human adipocytes. *Endocrinol.* 2005; 146:2176-2179.
- Contreras GA, O'Boyle NJ, Herdt TH, Sordillo LM.** Lipomobilization in periparturient dairy cows influences the composition of plasma nonesterified fatty acids and leukocyte phospholipid fatty acids. *J Dairy Sci.* 2010; 93:2508-2516.
- Drackley JK, Andersen JB.** Splanchnic metabolism of long-chain fatty acids in ruminants. In: *Ruminant physiology digestion, metabolism and impact of nutrition on gene expression, immunology and stress*, Ed; Sejrsen K, Hvelplund T, Nielsen MO, 1st Ed., Academic Publishers, Wageningen, Holland. 2006; pp. 199-224.
- Drackley JK, Dann HM, Douglas N, Guretzky NAJ, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ.** Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci.* 2005; 4:323-344.
- Drackley JK, Overton TR, Douglas NG.** Adaptation of glucose and long chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci.* 2001; 84:100-112.
- Faes MR, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Dias BL, Costa FR, Escocard RM.** Nitric oxide regulates steroid synthesis by bovine antral granulosa cells in a chemically defined medium. *Anim Reprod Sci.* 2009; 110(3-4):222-236.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N.** Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1994; 77:2695-2703.
- Galvão KN, Flaminio M, Brittin SB, Sper R, Fraga M, Caixeta L, Gilbert RO.** Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2010; 93(7):2926-2937.
- Goff JP.** Calcium and magnesium disorders. *Vet Clin North Am Food Anim Prac.* 2014; 30:359-381.
- González FD, Muiño R, Pereira V, Campos R, Benedito JL.** Relationship among blood indicators of lipomobilization and hepatic function during early lactation in high-yielding dairy cows. *J Vet Sci.* 2011; 12:251-255.
- Griffiths LM, Loeffler SH, Socha MT, Tomlinson DJ, Johnson AB.** Effects of supplementing complexed zinc, manganese, copper and cobalt on lactation and reproductive performance of intensively grazed lactating dairy cattle on the South Island of New Zealand. *Anim Feed Sci Technol.* 2007; 137:69-83.
- Hayırlı A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM.** Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition periods in Holsteins. *J Dairy Sci.* 2002; 85:3430-3443.
- Heins BJ, Hansen LB, Seykora AJ.** Calving difficulty and stillbirths of pure Holsteins versus crossbreds of Holstein with Normande, Montbeliarde, and Scandinavian. *Red. J Dairy Sci.* 2006; 89:2805-2810.
- Hoedemaker H, Prange D, Gundelach Y.** Body condition change ante- and postpartum, health and reproductive performance in German Holstein cows. *Reprod Dom Anim.* 2009; 44:167-173.
- Hoedemaker M, Prange D, Zerbe H, Frank J, Daxenberger A, Meyer HHD.** Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2004; 87:2136-2145.
- Joksimović Todorović M, Davidović V.** Changes in white blood pictures and some biochemical parameters of dairy cows in peripartum period and early lactation. *Mljekarstvo.* 2012; 62(2):151-158.
- LeBlanc SJ.** Monitoring programs for transition dairy cows. In: *Proc 26th World Biometrics Congress, Nice, France.* 2006; pp. 460-472.
- Little MW, O'Connell NE, Welsh MD, Mulligan FJ, Ferris CP.** Concentrate supplementation of a diet based on medium-quality grass silage for 4 weeks prepartum Effects on cow performance, health, metabolic status, and immune function. *J Dairy Sci.* 2017; 100:4457-4474.
- Machado VS, Bicalho MLS, Pereira RV, Caixeta LS, Knauer WA, Oikonomou G, Bicalho R. C.** Effect of an injectable trace mineral supplement containing selenium, copper, zinc, and manganese on the health and production of lactating Holstein cows. *Vet J.* 2013; 197:451-456.
- Machado VS, Oikonomou G, Lima SF, Bicalho MLS, Kacar C, Foditsch C, Bicalho RC.** The effect of injectable trace minerals (selenium, copper, zinc, and manganese) on peripheral blood leukocyte activity and serum superoxide dismutase activity of lactating Holstein cows. *Vet J.* 2014; 200(2):299-304.
- Martinez N, Risco CA, Lima FS, Bisinotto RS, Greco LF, Ribeiro ES, Santos JEP.** Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J Dairy Sci.* 2012; 95:7158-7172.
- McArt JA, Nydam DV, Oetzel GR.** Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2012; 95:505-566.
- Nayyar S, Gill VK, Malik VS, Roy KS, Singh R.** Vitamin E and selenium improve the blood biochemical composition of anoestrus buffalo heifers. *Indian J Anim Sci.* 2003; 73:654-656.
- NRC.** Minerals. In: *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*, Ed; Grossblatt N, 7th Ed., National Academy of Science, Washington, DC, USA. 2001; pp. 105-162.
- Ospina PA, Nydam DV, Stokol T, Overton TR.** Association between the proportion of sampled transition cows with increased nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate and disease incidence, pregnancy rate, and milk production at the herd level. *J Dairy Sci.* 2010; 93:3595-3601.
- Ömür A, Kırbas A, Aksu E, Kandemir F, Dorman E, Kaynar O, Uçar O.** Effects of antioxidant vitamins (A, D, E) and trace elements (Cu, Mn, Se, Zn) on some metabolic and reproductive profiles in dairy cows during transition period. *Pol J Vet Sci.* 2016; 19(4):697-706.
- Pogge DJ, Richter EL, Drewnoski ME, Hansen SL.** Mineral concentrations of plasma and liver after injection with a trace mineral complex differ among Angus and Simmental cattle. *J Anim Sci.* 2012; 90:2692-2698.
- Politis I.** Reevaluation of vitamin E supplementation of dairy cows bio-availability, animal health and milk quality. *Animal.* 2012; 6:1427-1434.
- Pontes GCS, Monteiro PLJ, Prata AB, Guardieiro MM, Pinto DAM, Fernandes GO, Sartori R.** Effect of injectable vitamin E on incidence of retained fetal membranes and reproductive performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015; 98:2437-2449.
- Salak-Johnson JL, McGlone JJX.** Making sense of apparently conflicting data Stress and immunity in swine and cattle. *J Anim Sci.* 2015; 85:81-88.
- Sales JNS, Pereira RVV, Bicalho RC, Baruselli PS.** Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer. *Livest Sci.* 2011; 142:59-62.

- Sayed MM.** Exuberant Ca²⁺ signaling in neutrophils a cause for concern. *Physiology*. 2000; 15:130-136.
- Scalia D, Lacetera N, Bernabucci U, Demeyere K, Duchateau L, Burvenich C.** In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability. *J Dairy Sci*. 2006; 89:147-154.
- Schäfers S, Von Soosten D, Meyer U, Drong C, Frahm J, Tröschler A, Dänicke S.** Influence of conjugated linoleic acids and vitamin E on biochemical, hematological, and immunological variables of dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci*. 2018; 101:1585-1600.
- Silvia WJ, McGinnis AS, Hatler TB.** A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. *Reprod Biol*. 2005; 5:19-29.
- Sordillo LM, Aitken SL.** Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 128:104–109.
- Stapleton SR.** Selenium an insulin mimetic. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(13-14):1874-1879.
- Strang BD, Bertics SJ, Grummer RR, Armentano LE.** Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes. *J Dairy Sci*. 1998; 81:728–739.
- Sundrum A.** Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. *Animals*. 2015; 5(4):978-1020.
- Tafari S, Ciani F, Iorio EL, Esposito L, Cocchia N.** Reactive oxygen species (ROS) and male fertility. In: *New discoveries in embryology*, Ed; WuB, 1st Ed., INTECH, Croatia 2015; 19-33.
- Tanaka T, Arai M, Ohtani S, Uemura S, Kuroiwa T, Kim S, Kamomae H.** Influence of parity on follicular dynamics and resumption of ovarian cycle in postpartum dairy cows. *Anim Reprod Sci*. 2008; 108:134-143.
- Tilman D, Cassman KG, Matson PA, Naylor R, Polasky S.** Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*. 2002; 418(6898): 671-677.
- Webb R, Nicholas B, Gong JG, Campbell BK, Gutierrez CG, Garverick HA, Armstrong DG.** Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod Suppl*. 2003; 61:71–90.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM.** Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 2005; 63:102-117.
- Wintergerst ES, Maggini S, Hornig DH.** Contribution of selected vitamins and trace elements to immune function. *Ann Nutr Metab*. 2007; 51(4):301-323.

Investigation of Ram Sperm Acrosome Integrity in Relation with Seminal Plasma Homocysteine and Nesfatin-1 Levels

Caner ÖZTÜRK^{1*}, Şükrü GÜNGÖR², Muhammed Enes İNANÇ², Neşe Hayat AKSOY³

¹Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Aksaray, Turkey

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

³Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Aksaray, Turkey

ABSTRACT

This study aimed to investigate the relationship between homocysteine, nesfatin-1 levels with acrosome integrity. Ejaculates were collected from six adult rams via artificial vagina, divided into five groups and diluted at 37 °C. The extenders, which contained cholesterol loaded cyclodextrin (CLC) 1.5 and 2.5 mg, cholesterol loaded 7-dehydrocholesterol (7-DCLC) 1.5 and 2.5 mg or no additive (control), were used for sperm dilution. Semen samples of all groups were cooled at 5°C and then frozen in liquid nitrogen vapor (-110~-120°C). Semen samples stored in liquid nitrogen then were thawed at 38°C for 30 seconds prior to examination. Acrosome integrity was examined with FITC-PNA staining. Homocysteine (HCY) and nesfatin-1 assays were performed with ELISA method. In the CLC 1.5 and 2.5 mg groups homocysteine levels were lower ($0.67\pm 0.11; 0.61\pm 0.26$) compared to control group (1.36 ± 0.9) ($p<0.05$). No statistical differences were observed between groups in nesfatin-1 levels ($p>0.05$). In CLC 2.5 mg, the values of spermatozoa with intact acrosome membrane (65.88 ± 2.84) were higher ($p<0.05$) than in control group (52.38 ± 2.97). Sperm acrosome integrity was negatively correlated with HCY level ($r = -.630$) and positive correlated with nesfatin-1 levels ($r = .460$) in thawed ram sperm. In conclusion, CLC has a cryoprotective effect on acrosome integrity and found to have beneficial effects on HCY level.

Keywords: Acrosome integrity, Cyclodextrin, 7-dehydrocholesterol, Homocysteine, Nesfatin-1

Koç Sperma Akrozom Bütünlüğünün Seminal Plazma Homosistein ve Nesfatin-1 Düzeyleri ile İlişkili Olarak İncelenmesi

ÖZ

Bu çalışmada homosistein, nesfatin-1 düzeyleri ile akrozom bütünlüğü arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Ejakülatlar, suni vajen yöntemiyle altı yetişkin koçtan alındı ve toplanan ejakülatlar beş gruba bölünerek 37 °C'de sulandırıldı. Sperma sulandırılmasında kolesterol yüklü siklodekstrin (CLC) 1.5 ve 2.5 mg, kolesterol yüklü 7-dehidrokolesterol (7-DCLC) 1.5 ve 2.5 mg içeren veya katkı maddesi içermeyen (kontrol) sulandırıcılar kullanıldı. Tüm gruplardaki sperma örnekleri 5 °C de soğutulduktan sonra sıvı nitrojen buharında (-110~-120° C) donduruldu. Sıvı nitrojen içinde saklanan sperma örnekleri incelenmek için 38 °C ve 30 saniyede çözündürüldü. Akrozom bütünlüğü, FITC-PNA boyama ile incelendi. Homosistein (HCY) ve nesfatin-1 testleri ELISA yöntemi ile yapıldı. CLC 1.5 ve 2.5 mg gruplarında homosistein seviyeleri kontrol grubuna (1.36 ± 0.9) göre daha düşük bulundu ($0.67\pm 0.11, 0.61\pm 0.26$) ($p < 0.05$). Nesfatin-1 düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi ($p > 0.05$). 2.5 mg CLC'de akrozom bütünlüğü bozulmamış sperma hücrelerinin oranları (65.88 ± 2.84) kontrol grubuna (52.38 ± 2.97) göre daha yüksek bulundu ($p < 0.05$). Sperma akrozom bütünlüğü, çözüm sonu koç spermasında HCY seviyesi ($r = -.630$) ile negatif, nesfatin-1 seviyeleri ($r = .460$) ile pozitif korelasyon gösterdi. Sonuç olarak, CLC'nin akrozom bütünlüğü üzerinde kriyoprotektif bir etki gösterdiği ve HCY seviyesi üzerinde faydalı olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akrozom bütünlüğü, Siklodekstrin, 7-dehidrokolesterol, Homosistein, Nesfatin-1

To cite this article: Öztürk C, Güngör Ş, İnanç M.E, Aksoy N.H. Investigation of Ram Sperm Acrosome Integrity in Relation with Seminal Plasma Homocysteine and Nesfatin-1 Levels. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):123-128

Submission: 27.11.2020

Accepted: 27.01.2021

Published Online: 26.02..2021

ORCID ID; CÖ: 0000-0003-0566-0684 ŞG: 0000-0003-3460-522X MEİ: 0000-0001-6954-6309NHA: 0000-0001-9039-555X

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

INTRODUCTION

Artificial insemination plays an important role in sheep breeding. Breeds with superior genetic characteristics can be grown with the application of this tool (Maxwell and Watson 1996). The lipid composition of plasma membrane of ram sperm is different compared to the other species (Yurdakök et al. 2015). Consequently, ram sperm cannot be frozen successfully as bull sperm (Salamon and Maxwell 2000). The lipid components of the spermatozoa membranes affect the ability of sperm to respond on freezing, as well as the ability of sperm to provide the acrosome reaction (Moore et al. 2005). The plasma membrane and outer acrosomal membrane of the sperm cell are very sensitive to the freeze-thaw process. These structures, consisting of thermodynamic phospholipids (65-70%) and pass irreversibly from the liquid phase to the gel phase when the membranes cool down (Watson 2000). The cholesterol-phospholipid ratio in the sperm plasma membranes changes during the freezing of the sperm, resulting in reduced fertility (Khan et al. 2017).

Cyclodextrin (CLC) is cyclic heptasaccharides consisting of β -(1-4) water-soluble glycopyranose units. CLC is used to add cholesterol to the cell membrane or to extract from the cell membrane (Purdy and Graham 2004). CLC is cholesterol-like hydrophobic compounds and carry the cholesterol of the cell plasma membrane into the hydrophobic region (Zidovetzki and Levitan 2007). When CLC is used in sperm cells, it ensures the removal of cholesterol that causes capacitation (Mocé et al. 2010). Researchers have demonstrated the ability to cholesterol loaded CLC in different species to increase sperm cryoprotection in stallion (Blommaert et al. 2016), ram (Naseer et al. 2015) and dog (Khan et al. 2017). Cholesterol is an important structural component of the membrane and takes part in the regulation of membrane function (Yeagle 1985). Cholesterol has many effects on the plasma membrane property. While reducing membrane permeability and phase changes, it provides a suitable environment for proteins and it is also a membrane antioxidant (Aksoy et al. 2010; Mocé et al. 2010). Cholesterol provides the transition temperature of the membranes and keeps them liquid, this feature allows it to reduce membrane damage (Glazar et al. 2009).

Homocysteine (HCY) is an amino acid produced by intracellular demethylation of methionine in methylation processes. The high level of HCY in the cell reveals its pathological effects by increasing oxidative stress (Voutilainen et al. 1999). Defective methylation, activation of apoptosis, induction of oxidative stress, altered nitric oxide bioavailability and increased inflammatory cytokine expression are molecular mechanisms of cellular dysfunction caused by HCY (Forges et al. 2007). High HCY concentration,

abnormal spermatogenesis and infertility were found to coexist in male animals (Kelly et al. 2005)

Nesfatin-1 (N1) is an anorexigenic peptide involved in nutrition and metabolic regulation. It is reported that N1 is found not only in the brain, but also in peripheral organs such as digestive organs, heart and reproductive organs (Kim and Yang 2012). N1 is co-localized with gonadotropin releasing hormone, so it has been reported to be involved in gonadotropin release (García-Galiano et al. 2012). Studies have shown the important role of N1 in regulating male reproductive functions (Gao et al. 2016, Ranjan et al. 2019). N1 is localized with oxytocin (Maejima et al. 2009), a neurohormone associated with reproduction and erection. It is stated that the in vitro administration of N1 has a positive role in the regulation of reproduction in male rats (Gao et al. 2016).

In this study, we evaluated the effect of CLC and cholesterol loaded 7-dehydrocholesterol (7-DCLC) modification on the freezing of merino ram sperm by determining acrosome integrity and aimed to investigate its relationship between HCY and N1 levels.

MATERIALS and METHODS

Animals and Semen Collection

Sperm samples were collected from six adult merino rams with an artificial vagina. Semen collection procedures involving the use of animals were performed at Bahri Dagdas International Agricultural Research Institute. The study was approved by Institute Ethics Committee (No 2016/51).

Semen Processing

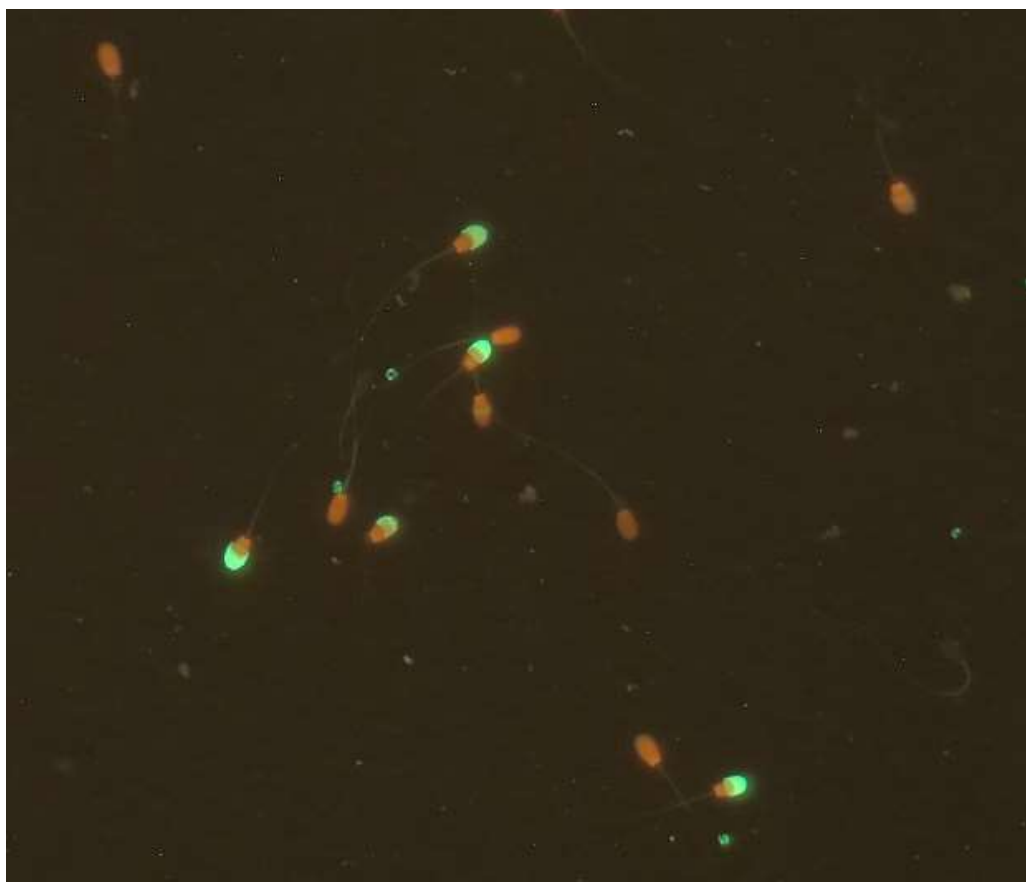
Tris Stock (T) extender (297.58 mM tris, 82.66 mM fructose, 96.32 mM citric acid, 15% egg yolk, 6% glycerol) was used as the main sperm extender in the study. Collected ejaculates (spermatozoa with >80% motility and concentration higher than 2×10^9 spermatozoa/ml) after mixing, the ejaculate was divided into five aliquots and diluted at 37 °C with base extenders containing CLC (1.5 and 2.5 mg), 7-DCLC (1.5 and 2.5 mg) and no additive) diluents (control). Semen samples were equilibrated at 5°C for 2 hours, and then loaded into 0.25 ml straws. Samples were frozen 5 cm above liquid nitrogen vapor for 12 minutes. Then stored in liquid nitrogen (-196°C). Straws were thawed after a one month later in a water bath at 38°C for 30 seconds and evaluated.

Assessment of Sperm Acrosome Integrity

Acrosome integrity was determined the method by Nagy et al. (2003). Thawed semen samples were diluted (1:3 with T) then 60 μ l were mixed with 10 μ l FITC-PNA and 2.5 μ l PI. Samples were incubated in dark at 37° C for 20 minutes. Sperm acrosome integrity was determined using a fluorescence microscope (Carl Zeiss Axioscope 5 GmbH 07745, Germany). Sperm cells displaying bright green fluorescence were

considered damaged, while those in red color in the acrosome cover that did not stain green fluorescence were considered intact.

Figure 1: Lectin/PI staining. Green headed shows damaged acrosome and red headed spermatozoon shows intact acrosome.



based on biotin double antibody technology (Shangai Sunred, Biological Tech., China). After the procedure

Semen Preparation for Enzyme Assays

To separate the cells from diluted seminal plasma, thawed semen samples were centrifuged at 4 °C and 800 rpm for 15 minutes. All samples were washed twice with phosphate buffered saline (PBS, ph 7.2, tablet/200 mL) after centrifugation, the supernatant was removed then pellet was completed to 500 µl with PBS. The prepared sperm suspension was sonicated with a probe for 10 seconds on ice.

HCY Assays

HCY peptides were blindly measured and read (450 nm) ELISA plate reader (ELx800 Absorbance Microplate Reader) by the Biotin double-antibody technology (Shangai Sunred, Biological Tech., China). Homocysteine concentrations were calculated from standard curves.

N1 Assays

N1 measurement was performed by commercial enzyme-dependent immune sorbent assay (ELISA)

of the ELISA kit, plates were read at 450 nm by the ELISA plate reader (ELx800 Absorbance Microplate Reader-Biotech).

Statistical Analysis

The normality and homogeneity of variances were checked with the help of the Shapiro-Wilk test. One Way Anova was used to evaluate sperm results and the results were expressed as mean \pm standard deviation. Analysis of variance, followed by Duncan's post hoc test to identify differences between groups. Differences with $p < 0.05$ values were considered statistically significant. SPSS 21 package program was used for analysis.

RESULTS

In 1.5 and 2.5 mg CLC groups, the values of spermatozoa with intact acrosome membranes (63.04% \pm 2.19% and 65.88% \pm 2.84% for 1.5 and 2.5

mg CLC groups, respectively) were statistically different ($p < 0.05$) compared to the control group (52.38 ± 2.97 ; Table 1). No statistical differences ($p < 0.05$) were found between the two 7-DCLC groups and the control group. Levels of homocysteine were lower ($p < 0.05$) in 1.5 mg CLC (0.67 ± 0.11) and 2.5 mg CLC (0.61 ± 0.26) compared to the control group

(1.36 ± 0.9 ; Table 1). There was no statistical difference between the experimental groups about nesfatin-1 ($p > 0.05$; Table 1). Furthermore, acrosome integrity of thawed ram semen was negatively correlated with HCY ($r = -.630$) and positively with N1 ($r = .460$; Table 2).

Table 1. Mean (\pm SEM) HCY, N1 levels and acrosome integrity in thawed ram semen.

Groups	HCY(μ mol/L)	N1(ng/ml)	Acrosome integrity (%)
Control	1.36 ± 0.9^a	1.71 ± 0.16	52.38 ± 2.97^{bc}
CLC 1.5 mg	0.67 ± 0.11^b	2.12 ± 0.39	63.04 ± 2.19^a
CLC 2.5 mg	0.61 ± 0.26^b	2.30 ± 0.91	65.88 ± 2.84^a
7-DCLC 1.5mg	0.85 ± 0.40^{ab}	1.78 ± 0.14	55.26 ± 1.44^b
7-DCLC 2.5 mg	1.06 ± 0.51^a	2.08 ± 0.25	51.76 ± 0.69^c
P	*	-	*

–: No significant difference.

* ($P < 0.05$).

Table 2. Correlation results in thawed ram semen.

		Acrosome integrity	HCY	N1
Acrosome integrity	Pearson Correlation	1	-.630**	.460*
	Sig. (2-tailed)		.001	.021
	N	25	25	25
HCY	Pearson Correlation	-.630**	1	-.408*
	Sig. (2-tailed)	.001		.043
	N	25	25	25
N1	Pearson Correlation	.460*	-.408*	1
	Sig. (2-tailed)	.021	.043	
	N	25	25	25

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

DISCUSSION

The highest acrosome integrity rate was obtained in the group supplemented with CLC and a negative correlation was determined between acrosome reacted spermatozoa and the HCY level. It was seen that the determined negative correlation with HCY level could be directly related to sperm freezing. Cholesterol shows its effect on the cell membrane by protecting the antioxidative enzymes and preventing their spread to reactive oxidative species (López-Revuelta et al. 2007). This information supports our conclusions

regarding the membrane integrity of cholesterol forms. In the cryopreservation of bull semen with CLC, it was provided a higher sperm membrane integrity after thawing (Purdy and Graham 2004). Positive result was obtained in the stallion semen as in the presented study (Moraes et al. 2015). Some researchers have found that the use of CLC conjugates on Piau swine (Pinho et al. 2016) and boar sperm (Tomás et al. 2011) has no protective effect on sperm parameters. This difference between the results of the studies is thought to be due to the dose difference.

In CLC-treated sperm, high cholesterol concentrations before cooling and low cholesterol loss during cryopreservation can be achieved. However, the presence of excess cholesterol in the plasma membrane can adversely affect its capacitation and acrosome reaction (Purdy and Graham 2004). Supplementing the ram sperm diluent with cholesterol conjugates and 7-DCLC has been shown to increase membrane integrity (Inanc et al. 2018). Amorim et al. (2009) stated that cholesterol or pelargonic used in freezing bull semen is beneficial for thawed sperm membrane. In the presented study, the highest acrosome integrity values were reached in CLC groups. Although the effect of HCY on the male reproductive system is not fully explained, there is a positive correlation between the increase in seminal plasma HCY level and the decrease in spermatological parameters (Wallock et al. 2001). It is thought that HCY creates its pathological effect by inducing oxidative stress, which explains the etiology of the metabolite in defective sperm function. (Sibrian-Vazquez et al. 2010). HCY and glutathione (GSH) concentrations in the sperm cell were significantly lower in normozoospermic men and increased in those with pathological sperm parameters (Kralikova et al. 2017). These results are consistent with the negative correlation with the acrosome integrity we presented in our study. The increase in acrosome integrity observed in humans (Renard et al. 1996) and stallion (Trimeche et al. 1999) as a result of minimizing the level of lipid peroxidation and it is consistent with the decreased homocysteine level with increased acrosome integrity observed in this study.

N1 is the 82-amino acid hormone important in the regulation of reproduction derived from nucleobindin 2 precursor protein (Gao et al. 2016). It was localized in leydig cells in the testicles. N1 levels in testicles of adult rats were found to be higher compared to pubertal rats (García-Galiano et al. 2012). Tamer et al. (2018) showed that N1 protects spermatogenic cells by providing pro-inflammatory / anti-inflammatory cytokine balance in rats. N1 induced enhanced energy substrate transport may be responsible for promoting spermatogenesis. N1 significantly reduced oxidative stress by its stimulating effect on testicular activities. Thus, it is stated that nesfatin-1 positively affects spermatological parameters. Ranjan et al. (2019) reported that nesfatin-1 increased sperm count and fertility by increasing testicular function. In our study, it was positively correlated with acrosome integrity.

CONCLUSIONS

Adding CLC in semen extender had a protective effect on freezing ram semen. HCY and N1 levels were found to have an effect on semen freezing, and it was suggested that it would be useful to investigate spermatological parameters and HCY and N1 levels together in future studies.

Ethics Committee Information: The study was approved by Institute Ethics Committee (Bahri Dagdas International Agricultural Research Institute, No 2016/51).

Conflict of interest: The authors declare that there is no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

REFERENCES

- Aksoy M, Akman O, Lehimcioğlu NC, Erdem H.** Cholesterol-loaded cyclodextrin enhances osmotic tolerance and inhibits the acrosome reaction in rabbit spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 2010; 120(1-4): 166-172.
- Amorim EAM, Graham JK, Spizziri B, Meyers M, Torres CA.** Effect of cholesterol or cholesteryl conjugates on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology.* 2009; 58: 210-214.
- Blommaert D, Franck T, Donnay I, Lejeune JP, Dettileux J, Serteyn D.** Substitution of egg yolk by a cyclodextrin-cholesterol complex allows a reduction of the glycerol concentration into the freezing medium of equine sperm. *Cryobiology.* 2016; 72: 27-32.
- Forges T, Monnier-Barbarino P, Alberto, JM, Gueant-Rodriguez RM, Daval JL, Gueant JL.** Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(3): 225-238.
- Gao X, Zhang K, Song M, Li X, Luo L, Tian Y, Zhang Y, Li Y, Zhang X, Ling Y, Fang F, Liu Y.** Role of nesfatin-1 in the reproductive axis of male rat. *Sci Rep.* 2016; 6: e32877.
- García-Galiano D, Pineda R, Ilhan T, Castellano JM, Ruiz-Pino F, Sánchez-Garrido MA, Vazquez MJ, Sangiao-Alvarellos S, Romero-Ruiz A, Pinilla L, Diéguez C, Gaytán F, Tena-Sempere M.** Cellular distribution, regulated expression, and functional role of the anorexigenic peptide, NUCB2/nesfatin-1, in the testis. *Endocrinology.* 2012;153(4): 1959-1971.
- Glazar AI, Mullen SF, Liu J, Benson JD, Critser JK, Squires EL, Graham JK.** Osmotic tolerance limits and membranep permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. *Cryobiology.* 2009; 59: 201–206.
- Inanc ME, Uysal O, Ata A.** Cryopreservation and evaluation of Akkaraman ram semen with 7-dehydrocholesterol. *Vet J Ankara Univ.* 2018; 65: 187-192.
- Kelly TL, Neaga OR, Schwahn BC, Rozen R, Trasler JM.** Infertility in 5,10- methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)-deficient male mice is partially alleviated by lifetime dietary betaine supplementation. *Biol Reprod.* 2005; 72: 667–677.
- Khan J, Tahir MZ, Khalid A, Sattar A and Ahmad N.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on cryosurvival of dog spermatozoa. *Reprod Domest Anim.* 2017; 52: 265–268.
- Kim J, Yang H.** Nesfatin-1 as a new potent regulator in reproductive system. *Dev Reprod* 2012; 16(4): 253-264.
- Kralikova M, Crha I, Huser M, Melounova J, Zakova J, Matejovicova M, Ventruba P.** The intracellular concentration of homocysteine and related thiols is negatively correlated to sperm quality after highly effective method of sperm lysis. *Andrologia.* 2017; 49(7): e12702.
- López-Revuelta A, Sánchez-Gallego JI, García-Montero AC, Hernández-Hernández A, Sánchez-Yagüe J, Llanillo M.** Membrane cholesterol in the regulation of aminophospholipid asymmetry and phagocytosis in

- oxidized erythrocytes. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42(7): 1106-1118.
- Maejima Y, Sedbazar U, Suyama S, Kohno D, Onaka T, Takano E, Yoshida N, Koike M, Uchiyama Y, Fujiwara K, Yashiro T, Horvath TL, Marcelo OD, Tanaka S, Dezaki K, Oh-I S, Hashimoto K, Shimizu H, Yada T.** Nesfatin-1-regulated oxytocinergic signaling in the paraventricular nucleus causes anorexia through a leptin-independent melanocortin pathway. *Cell Metab.* 2009; 10(5): 355–365.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent Progress in The Preservation of Ram Semen. *Anim Reprod Sci.* 1996; 42: 55-65.
- Mocé E, Blanch E, Tomás C, Graham JK.** Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. *Reprod Domest Anim.* 2010; 45: 57-66.
- Moore AI, Squires EL, Graham JK.** Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology.* 2005; 51: 241-249.
- Moraes EA, Matos WCG, Graham JK, Ferrari Jr WD.** Cholestanol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Anim Reprod Sci.* 2015; 158: 19-24.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM.** A triple-stain flow cytometric method to assess plasma and acrosomemembrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod.* 2003; 68: 1828-1835.
- Naseer Z, Ahmad E, Aksoy M, Küçük N, Serin İ, Ceylan A, Boyacıoğlu M, Kum C.** Protective effect of cholesterol-loaded cyclodextrin pretreatment against hydrogen peroxide induced oxidative damage in ram sperm. *Cryobiology.* 2015; 71: 18–23.
- Pinho RO, Lima DM, Shiomi HH, Siqueira JB, Silveira CO, Faria VR, Lopes PS, Guimarães SE, Guimarães JD.** Effect of cyclodextrin-loaded cholesterol conjugates on plasma membrane viability of Piau swine breed frozen/thawed spermatozoa. *Cryobiology.* 2016; 73: 1-6.
- Purdy P, Graham J.** Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology.* 2004; 48: 36–45.
- Ranjan A, Choubey M, Yada T, Krishna A.** Direct effects of neuropeptide nesfatin-1 on testicular spermatogenesis and steroidogenesis of the adult mice. *Gen Comp Endocrinol.* 2019; 271: 49-60.
- Renard P, Grizard GG, Sion JF, Boucher B, Lannou DDL.** Improvement of motility and fertilization potential of post thawhuman sperm using glutamine. *Cryobiology.* 1996; 33: 311–319.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 62(1-3): 77-111.
- Sibrian-Vazquez M, Escobedo JO, Lim S, Samoei GK, Strongin RM.** Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins. *Proc Natl Acad Sci.* (2010); 107(2): 551-554.
- Tamer SA, Yildirim A, Köroğlu MK, Çevik Ö, Ercan F, Yeğen BÇ.** Nesfatin-1 ameliorates testicular injury and supports gonadal function in rats induced with testis torsion. *Peptides.* 2018; 107: 1-9.
- Tomás C, Blanch E, Hernandez M, Gil MA, Roca J, Vazquez JM, Martínez EA, Mocé E** Treating boar sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins widens the sperm osmotic tolerance limits and enhances the in vitro sperm fertilizing ability. *Anim Reprod Sci.* 2011; 129: 209-220.
- Trimeche A, Yvon JM, Vidament M, Palmer E, Magistrini M.** Effects of glutamine, proline, histidine and betaine on post-thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology.* 1999; 52: 181-191.
- Voutilainen S, Morrow JD, Roberts LJ, Alfthan G, Alho H, Nyssonen K, Salonen JT.** Enhanced in vivo lipid peroxidation at elevated plasma total homocysteine levels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 1263-1266.
- Wallock LM, Tamura T, Mayr CA, Johnston KE, Ames BN, Jacob RA.** Low seminal plasma folate concentrations are associated with low sperm density and count in male smokers and nonsmokers. *Fertil Steril.* 2001;75(2):252-259.
- Watson PF.** The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60:481-492.
- Yeagle PL.** Cholesterol and the cell membrane. *Biochim Biophys Acta Rev Biomembranes.* 1985; 822: 267-287.
- Yurdakök B, Tekin K, Daskin A, Filazi A.** Effect of polychlorinated biphenyls 28,30 and 118 on bovine spermatozoa in vitro. *Reprod Domest Anim.* 2015; 50: 41-47.
- Zidovetzki R, Levitan I.** Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Bioch Bioph Acta.* 2007; 1768(6): 1311-1324.

Cataract Evaluation in Owned Patients Admitted to the Clinic for Eye Diseases: A Retrospective Study 2018-2020

Kamuran PAMUK^{1*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

In this study, between March 2018 and December 2020 27 dogs brought to İzmir Pamuk Veterinary Therapy Center were evaluated for cataracts.. All dogs brought in as a result of the examination were diagnosed with cataracts. It was determined that the dogs had 12 different breeds (Labrador Retriever, Pug, Spaniel Cocker, Yorkshire Terrier, Pekingese Terrier, mix-breed, Shih Tzu, Miniature Schnauzer, Rottweiler, Doberman, German Shepherd Dog, Siberian Husky, Boxer). 14 of the cases were male and 13 were female. The average age of the general population was 8.25. Of the dogs diagnosed with cataracts, 21 were neutered and 6 were not. In the information about the feeding of dogs, it was noted that 9 of them were fed with home meals, 18 of them were fed with ready-made food, their ages ranged between 5 and 12. Cataract was diagnosed in 15 dogs bilaterally and 12 dogs unilateral. While no insipient cataracts were observed in male dogs, more mature cataracts were detected in female dogs. Among those with bilateral cataracts, mature and hypermature ones were operated.

Keywords: Breed, Cataract, Dog, Gender, Intraocular pressure.

Kliniğe Göz Hastalıkları ile Getirilen Sahipli Hastalarda Katarakt Değerlendirilmesi: Retrospektif Çalışma 2018-2020

ÖZ

Bu çalışmada, Mart 2018-Aralık 2020 tarihleri arasında Pamuk Veteriner Terapi Merkezi'ne getirilen 27 köpek katarakt açısından değerlendirmeye alındı. Yapılan muayene sonucu getirilen köpeklerin tamamına katarakt teşhisi konuldu. Köpeklerin 12 ayrı ırka (Labrador Retriever, Pug, Spaniel Cocker, Yorkshire Terrier, Pekinez Terrier, melez ırk, Shih Tzu, Miniature Schnauzer, Rottweiler, Doberman, Alman çoban köpeği, Sibiry Husky, Boxer) sahip olduğu belirlendi. Vakaların 14'ü erkek, 13'ü dişi köpekten oluştu. Genel populasyonun yaş ortalamaları 8,25 idi. Katarakt teşhisi konulan köpeklerin 21'i kısırlaştırılmış, 6'sı ise kısırlaştırılmamıştı. Köpeklerin beslenmesine ilişkin bilgide, 9'unun ev yemekleri ile, 18'inin hazır mamalar ile beslendiği, yaşlarının (2 ile 13 yaş arası) arasında değiştiği kaydedildi. Köpeklerin 15'ine bilateral, 12'sine ise ünilateral katarakt teşhisi konuldu. Erkek köpeklerde insipient katarakt gözlenmezken, dişi köpeklerde daha fazla matür katarakt belirlendi. Bilateral katarakt olanlar arasında matür ve hipermatür olanlar ameliyat edildi.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet, Irk, İntraokuler basınç, Katarakt, Köpek.

To cite this article: Pamuk, K. Cataract Evaluation in Owned Patients Admitted to the Clinic for Eye Diseases: A Retrospective Study 2018-2020. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):129-136

Submission: 19.01.2021 Accepted: 26.02.2021 Published Online 27.02.2021

ORCID ID; KP: 0000-00015490939X

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

GİRİŞ

Köpeklerin görme kaybının önde gelen sebeplerinden biri olan katarakt; lens veya lens kapsülünün opaklaşması olarak da tanımlanır (Biros ve ark. 2000, Donzel ve ark. 2017). Lensteki opaklaşma bölgeleri, etiyojiye, lens içindeki konuma, yaşa ve gelişme hızına göre değişiklik gösterir. Katarakt, ileri evrelerde görme kaybına yol açabileceğinden köpeklerde klinik öneme sahip olmakla birlikte, oldukça yaygın karşılaşılan bir durumdur (Glover ve Constantinescu 1997, Ofri 2008). Aynı zamanda katarakt, retina dekolmanı, üveit, lens luksasyonu, lens kaynaklı sekonder glokom gibi önemli komplikasyonlar ile de ilişkilidir (Donzel ve ark. 2017).

Genetik anormallikler en yaygın nedenler arasında yer almakla birlikte; (Davidson ve Nelms 1999, Guerra ve ark. 2018) ırka, konjenital, senil, metabolik hastalıklara (diabetes mellitus, hipokalsemi) sekonder, beslenme bozukluklarına, lens travmaları, yangı, ilaçlar veya toksik maddelere bağlı olarak da gelişebilmektedir (Adkins ve Hendrix, 2005, Donzel ve ark. 2017). Köpeklerde kataraktın ikinci en yaygın nedeninin diabetes mellitus olduğu kaydedilmiştir (Basher ve Roberts 1995, Beam ve ark. 1999). Safkan köpeklerin, melez köpeklere göre katarakt oluşumuna daha yatkın oldukları, özellikle; LR (Labrador) ve JRT (Jack Russell Terrier) ırkı köpeklerde sıklıkla görülmektedir (Maggs ve ark. 2008, Oberbauer ve ark. 2008, Moeller ve ark. 2011). JRT ırkı köpeklerde ön ve arka kortikal katarakt olmak üzere iki tip kalıtsal katarakt gelişmekle birlikte, LR ırkı köpeklerde arka subkapsüler ve ön veya ekvator kortikal katarakt şeklinde gözlenmektedir. Ayrıca, genetik bir durum olan birincil lens luksasyonu JRT'de katarakt oluşumunu teşvik eden bir durum olup, oluşabilecek komplikasyonlar açısından potansiyel bir risk faktörü olarak görülmektedir (Guerra ve ark. 2018). Bazı ırklar, Minyatür Schnauzer gibi hem kalıtsal hem de diyabetik katarakt geliştirmeye oldukça yatkındır. Bu ırktaki köpeklerde görülen kalıtsal kataraktın otozomal resesif özellikte olduğu, fakat spesifik bir genin tanımlanmadığı kaydedilmiştir (Rogen ve Regabdarkolae 2020).

İlerlemiş kataraktın, ışık ışınlarının retinaya odaklanmasını engelleyerek körlüğe neden olabileceği, ancak fokal kataraktın görme yeteneğini etkilemeyebileceği bildirilmiştir. Toy Poodle, Minyatür Poodle, İngiliz Cocker Spaniel, Boston Terrier, Golden Retriever, Rottweiler, Labrador Retriever, Minyatür Schnauzer, Bichon Frise ve Chow Chow, Toy Poodle dahil olmak üzere safkan köpeklerin çoğunda katarakt oldukça yaygındır. Her yaşta ortaya çıkabileceği gibi; prevalansı köpeklerde yaşla birlikte artmaktadır (Davidson ve Nelms 1999, Adkins ve Hendrix, 2005, Boumworcel ve ark. 2009). Kataraktın prevalansı, birçok ülkede yapılan çalışmalarda %5,4 ila %9 olarak bildirilmiştir. Prevalansı; ırka bağlı kataraktlarda %2,42 olduğu rapor edilmiştir. Bir diğer çalışmada, ırka bağlı kataraktın en çok Smooth Fox Terrier, Havanese, Bichons Frise, Boston Terrier, Minyatür Poodle ve

Silky Terrier ırkı köpeklerde gözleendiği kaydedilmiştir (Gelatt ve MacKay 2005, Donzel ve ark. 2017).

Lenstin opaklanma derecesine göre katarakt; dört gruba ayrılmaktadır. İnsipient (ilk evre) katarakt durumunda opasifikasyon lensin <%10 ila %15'ini kapsar (Davidson ve Nelms, 1999). Olgunlaşmamış kataraktlar, lensin küçük bir bölümünü veya tamamını etkileyebileceğinden, görünümü büyük ölçüde değişkenlik gösterir. Olgunlaşmamış kataraktlarda tapetal yansıma belirgin olup, ancak katarakt iyi geliştiğinde görme yeteneği azalabilir. Tüm lensin etkilendiği olgun katarakt durumunda, lens katı beyaz ve opak görünür ve görme ciddi derecede azalır. Hipermatür kataraktlarda genellikle lens kapsülünün büzülmesi şekillendiğinden kristal bir görünüme sahiptir. Aynı zamanda, lens erimeye ve emilmeye maruz kalır. Bu durumda, tapetal bir yansımanın mevcut olabileceği gibi olmayabileceği de belirtilmiştir. Hipermatür katarakt durumunda görme yeteneği, erime derecesine bağlı olarak değişkenlik gösterir (Adkins ve Hendrix, 2005, Gelatt ve MacKay 2005).

Kataraktın tedavisi için önerilen cerrahi yöntemler olan ekstrakapsüler ve intrakapsüler lens ekstraksiyonunun yanı sıra, son zamanlarda fakoemülsifikasyon tekniği veteriner oftalmolojide katarakt tedavisi için ilk seçenek ve en sık uygulanan cerrahi prosedür haline gelmiştir (Wilkie ve ark. 2006). Fakoemülsifikasyon tekniğinin başarı oranının yüksek olduğu, takip sürelerine bağlı olarak %85 ila %90'ının üzerinde olduğu kaydedilmiştir (Davidson 1991, Sigle ve Nasisse 2006, Lim ve ark. 2016). Fakat; aynı zamanda desantrasyon, intraoküler lens, arka lens kapsülünün opaklaşması, glokom, anterior üveit, yara hattının kapanmaması, retina dekolmanı, postoperatif oküler hipertansiyon, dislokasyonu, hifema, kornea ülseri, kornea endotel hücre kaybı ve endoftalmis gibi çeşitli postoperatif komplikasyonlar da meydana gelebilmektedir (Sigle ve Nasisse 2006, Guerra ve ark. 2018, Newbold ve ark. 2018).

Bu çalışmanın amacı, farklı ırk ve cinsiyetteki köpeklerde katarakt görülme sıklığı ve göz bulgularının değerlendirilmesidir.

MATERYAL ve METOT

Pamuk Veteriner Terapi Merkezi'ne göz hastalıkları şikayeti ile getirilen köpeklerin katarakt değerlendirilmesi için Mart 2018- Aralık 2020 tarihleri arasında kaydı alındı. İncelenen veriler arasında yaş, ırk, cinsiyet, vücut ağırlığı, intraoküler basınç, kastrasyon veya ovariohisterektomi durumu, kan şekeri, beslenme şekli, korneal lezyon tapetal ve pupillar refleks ve kataraktın evresi yer almaktadır. İnsipient (n=2, 3 göz) ve immatür (n=11,13 göz) vakaların matür duruma ulaşmasını bekledikten, diğerleri ise klinik muayeneleri yapıldıktan sonra Ekstrakapsüler Katarakt Ekstraksiyonu (Ekke Metodu) ile operasyonları gerçekleştirildi. Fundusun indirekt oftalmaskopi fundus muayenesi sonucunda, tapetal refleksin engellemediği belirlendiyse elektoretinografi (ERG) yapılmadı. Vakaların göz basınçları Tono-Pen XL

Tonometre, kan şeker düzeyleri FUJI DRI-CHEM 4000ie, hemogramları MINDRAY 3000 cihazı ile ölçüldü. Korneal lezyon varlığı florasein boya ile belirlendi.

BULGULAR

Bu çalışmada, Ocak 2018-Aralık 2020 tarihleri arasında Pamuk Veteriner Terapi Merkezi'ne getirilen 27 köpek katarakt açısından değerlendirmeye alındı. Köpeklerin ortalama yaşları 2 ile 13 yaşlar arasında idi. Kliniğe başvuran farklı ırklara ait 27 köpeğin tamamına katarakt teşhisi konuldu. Genel populasyonun yaş ortalamaları 8,25 idi. Labrador Retriever (n=5) (Şekil 3), Pug (n=2), Spaniel Cocker (n=3), Yorkshire Terrier (n=2) (Şekil 1), Pekinez Terrier (n=1), melez ırk (n=5) (Şekil 4), Shih Tzu (n=1), Miniature Schnauzer (n=1), Rottweiler (n=2), Doberman (n=1), Alman Çoban Köpeği (n=2), Sibirya Husky (n=1) (Şekil 2), Boxer (n=1) ırklarına ait köpeklerin yaş ortalamaları sırasıyla; 9, 11, 5, 7, 13, 9, 2, 5, 8, 9, 7, 7, 10 yaşlarında idi. Köpeklerin yaş, ırk, cinsiyet, vücut ağırlığı, intraokuler basınç, kastrasyon ve ovaryohistektomi geçirip geçirmediği, kan şeker düzeyleri, beslenme durumları, korneal lezyon, tapetal ve pupillar refleks ve kataraktın evrelerine ilişkin bilgiler Tablo' da verilmiştir. Vakaların 14'ü erkek, 13'ü dişi köpekten oluştu. Erkek köpeklerin (20 göz) 9'unda immatüre (%45), 7'sinde

matür (%35), 4'ünde (%20) hipermatür evrede katarakt bulundu. Erkek köpeklerde insipient katarakt gözlenmedi. Dişi köpeklerin ise (22 göz) 3'ünde (%13,6) insipient, 4'ünde (%18,2) immatür, 12'sinde (%54,6) matür, 3'ünde (%13,6) hipermatür katarakt belirlendi.

Toplam 27 köpeğe ait 42 kataraktlı gözün 3'ünde (%7,1) insipient, 13'ünde (%30,9) immatür, 19'unda (%45,2) matür, 7'sinde (%16,6) hipermatür katarakt belirlendi. Vakaların 15'i bilateral olup, bilateral vakalarda kan şeker düzeyleri normalin (80-129 mg/dl) (Nelson 1995, Schaer 2003) üzerinde saptandı. Aynı zamanda, bilateral vakaların 6'sının ev yemekleri (%40), 9'unun (%60) hazır mama ile beslendikleri belirlendi. Vakaların tamamında intraokuler basınç normal sınırlar (15-25 mmHg) (Şaroğlu 2013) içerisinde tespit edildi. Toplam 42 gözün 8'inde (%19) korneal lezyon saptanırken, insipient katarakt evresinde olanlarda rastlanmadı. Yaşı 9'un altında olan (2-8 yaş arası) 13 vakada (20 gözün 10'u matür, 2'si hipermatür, 5'i immatür, 3'ü insipient) değişik evrelerde katarakt belirlendi. Yaşı 9'un üzerinde olan (9-13 arası) 22 vakada (22 gözün 9'u matür, 5'i hipermatür, 8'i immatür) vakaların hiçbirinde insipient evreye rastlanmadı.



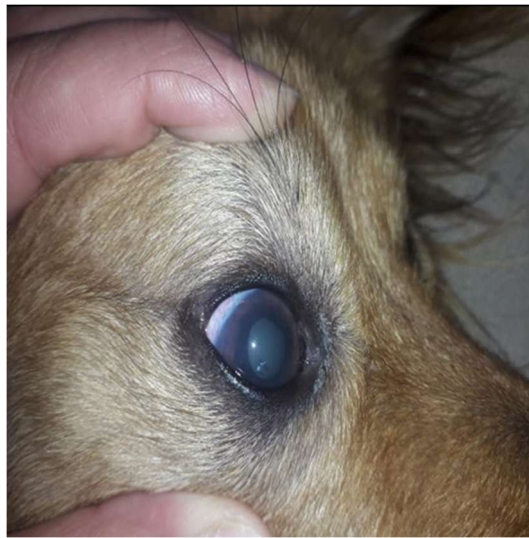
Şekil 1: Yorkshire cinsi köpekte matür katarakt



Şekil 2: Sibarya Husky cinsi köpekte sağ gözde matür, sol gözde immatür katarakt



Şekil 3: Labrador Retriever cinsi köpekte matür katarakt



Şekil 4: Melez ırkta matür katarakt

Tablo. Kliniğe getirilen 27 vakaya ait farklı parametre bilgilerine ait sonuçları.

Vaka sayısı	Yaş	İrk	Cinsi yet	Küçük ırk (0-10 kg)	Orta ırk (10-40 kg)	Büyük ırk (40 ve üstü)	İntraokuler basınç (mmHg) Sağ-Sol	Kastrasyon veya ovariohisterektomi	Kan şekeri (mg/dl)	Beslenme şekli	Korneal lezyon	Tapetal refleks	Pupillar refleks	Unilateral (U)/ Bilateral (B)	İnsipient	İmmatür	Matür	Hipermatür
1	11	Labrador Retriever	Erkek		32		16,3-17,0	+	114	Hazır mama	-	+	+	Ü	-	+	-	-
2	8	Mix	Dişi		38		14,5-16,2	+	156	Hazır mama	+	-	-	B	-	-	++	-
3	13	Pug	Dişi	5			18,1-17,6	+	92	Hazır mama	+	-	+	U	-	-	+	-
4	7	Yorkshire	Erkek	4,5			20,1-20,4	-	165	Ev yemekleri	-	+	+	B	-	+	+	-
5	5	Alman çoban köpeği	Erkek			45	13,7-13,4	-	143	Ev yemekleri	-	-	+	B	-	-	-	++
6	10	Melez ırk	Erkek			48	15,9-15,1	+	106	Hazır mama	-	-	+	U	-	-	+	-
7	9	Doberman	Erkek		29		17,4-17,1	+	94	Ev yemekleri	+	-	+	U	-	-	-	+
8	10	Boxer	Erkek		33		18,8-19,3	-	87	Ev yemekleri	-	+	+	U	-	+	-	-
9	9	Alman çoban köpeği	Dişi			42	16,7-17,1	+	137	Ev yemekleri	+	-	-	B	-	-	+	+
10	9	Spaniel Cocker	Dişi		23		17,3-17,3	+	108	Hazır mama	+	+	+	U	-	+	-	-
11	6	Labrador Retriever	Erkek		38		20,7-21,1	+	171	Hazır mama	-	-	+	B	-	+	+	-
12	10	Rottweiler	Dişi			45	15,9-16,1	+	166	Hazır mama	+	-	+	B	-	-	+	+
13	6	Melez ırk	Dişi	9			18,2-18,0	+	73	Hazır mama	-	-	+	U	-	-	+	-
14	7	Labrador Retriever	Erkek			42	17,5-16,9	+	80	Hazır mama	-	-	+	U	-	-	+	-
15	7	Rottweiler	Erkek			41	18,9-17,6	+	87	Ev yemekleri	-	+	+	U	-	+	-	-
16	10	Pug	Erkek	6,7			15,6-16,9	+	110	Ev yemekleri	-	+	+	U	-	-	-	+
17	3	Spaniel Cocker	Erkek		16		19,8-19,6	-	132	Hazır mama	-	+	+	B	-	+	-	-
18	8	Yorkshire	Erkek	4,5			22,1-21,8	-	145	Hazır mama	-	-	+	B	-	+	++	-
19	12	Labrador Retriever	Erkek			45,5	14,7-15,1	+	83	Hazır mama	-	-	+	U	-	-	+	-
20	13	Pekinez Terrier	Dişi	4,4			16,4-16,2	+	183	Hazır mama	-	-	+	B	-	-	+	+
21	7	Sibarya Husky	Dişi		36		13,9-14,4	+	149	Hazır mama	+	-	+	B	-	+	+	-

22	9	Labrador Retriever	Erkek		41	17,1-17,8	+	137	Ev yemekleri	+	-	+	B	-	++	-	-
23	11	Melez ırk	Dişi	8,7		15,6-15,2	+	170	Ev yemekleri	-	-	-	B	-	-	++	-
24	12	Melez ırk	Dişi		22	17,9-16,9	+	110	Ev yemekleri	-	+	+	B	-	+	+	-
25	2	Shih Tzu	Dişi	5		19,2-19,5	-	125	Hazır mama	-	+	+	B	++	-	-	-
26	5	Miniature Schnauzer	Dişi	3		18,8-18,1	+	89	Hazır mama	-	+	+	U	+	-	-	-
27	4	Spaniel Cocker	Dişi		16	17,0-17,6	+	139	Hazır mama	-	+	+	B	-	+	+	-

TARTIŞMA

Katarakt, köpeklerde tedavi edilebilir körlüğün en yaygın nedenidir (Glover 1997). Fokal katarakt görmeyi etkileyebilir, ancak şiddetli katarakt lensin ışık ışınlarını retinaya odaklama yeteneğini bozarak körlüğe neden olabilir. Katarakt; kaniş, minyatür ve standart kaniş, İngiliz cocker spaniel, Boston terrier, golden retriever, rottweiler, Labrador retriever, minyatür schnauzer, bichon frize ve chow chow dahil olmak üzere safkan köpeklerde yaygındır (Rubin et al. 1972, Rubin 1989). Her yaşta ortaya çıkan; ancak köpeklerde prevalansı yaşla birlikte artan bir durumdur (William 2004). Genetik anormallikler kataraktların en yaygın nedenleri arasında yer alır (Davidson et al. 1999). Diabetes mellitus, köpeklerde kataraktların en yaygın ikinci nedenidir (Basher 1995, Beam et al. 1999). Diğer, daha az yaygın nedenler arasında diğer metabolik hastalıklar, toksinler, ilaçlar, doğumsal anormallikler, beslenme yetersizlikleri, travma, radyasyon tedavisi ve yaşlanma gelmektedir (Engle ve Spencer 1996, Fischer 1989).

Park ve ark. (2009), farklı ırklara ait katarakt prevalansını minyatür kanişte %20,0, Yorkshire Terrier'de %19,6 ve Shih Tzu'da %16,9 olduğunu, genel popülasyonda, dişilerin katarakt oranının erkeklerden önemli ölçüde daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Katarakt oluşumu için ortalama yaşın $8,3 \pm 3,9$ yıl olduğunu, minyatür kaniş ve Yorkshire Terrier'de katarakt başlangıç yaşının daha yüksek, Minyatür Schnauzer grubundakilerin ise daha düşük olduğunu kaydetmiştir. Lim ve ark. (2011) 44 köpeğin (77 göz) yaş ortalamasının 7,9 olduğunu, tedavi edilen gözlerin başarı oranının yüksek olduğunu rapor etmiştir. Ayrıca, tüm gruplarda, olgun ve hipermatür kataraktların başarı oranının, olgunlaşmamış kataraktlardan daha düşük olduğunu kaydetmiştir. Donzel ve ark. (2017) 2739 köpeğin dahil edildiği çalışmada katarakttan etkilenen tüm köpeklerin ortalama yaşının 9 olduğunu bildirmiştir.

Bir başka çalışmada, en yüksek katarakt prevalansına sahip ırkların Smooth Fox Terrier (%11,70), Havanese (%11,57), Bichon Frise (%11,45), Boston Terrier (%11,11), minyatür kaniş (%10,79), ipeksi Terrier (%10,29) ve Toy Poodle (%10,21) olduğu bildirilmiştir. Cinsiyetin, kataraktı sınırlı ırklarda etkilediği ve yaşın çeşitli cinsler arasında farklılık gösterdiği rapor edilmiştir. Melez köpeklerde katarakt oluşumunun, 4 ila 7 yaşından sonra daha yüksek olduğu görülmüştür (Gelatt ve Mackay 2005).

Bu çalışmada, genel popülasyonda katarakt tanısı konulan 27 köpeğin yaş ortalaması 8,25 olup, ırklar açısından değerlendirdiğimizde, katarakt oluşumu en fazla Labrador Retriever, melez ırk ve Spaniel Cocker'da saptandı. Erkek ve dişilerde katarakt görülme oranları birbirine yakın olmakla birlikte, kataraktın matür evresi dişilerde daha fazla gözlemlendi. Yaşı büyük köpeklerde, hipermatür ve immatür evrelerin daha fazla görülmesi, yaşın; katarakt ile

arasındaki ilişkiye dair kanıtlar sunmaktadır. Bu durum diğer literatürler ile paralellik göstermektedir.

Senil katarakt için, büyük ırk köpeklerde 6 yaş ve küçük ırk köpeklerde 10 yaş üstünün baz alındığı bildirilmiştir (Donzel ve ark. 2017). Bizim çalışmamızda, küçük ırk köpeklerin 8,3 büyük ırk köpeklerin ise 8,62 yaş ortalamasına sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önce de, cinsler arasında katarakt prevalansı ile vücut büyüklüğü arasındaki ilişkiye atıfta bulunulmuştur (Gelatt ve Mackay 2005). Köpeklerde vücut büyüklüğü, yaşla ilgili katarakt insidansının birbiriyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Urfer et al. 2011). Buna göre, bizim çalışmamızın sonuçlarını diğer çalışmalar desteklemektedir. Geriatrik bir köpekte, başka bir nedenin bulunmadığı durumlarda katarakt başlangıcı meydana geldiğinde, yaşlılık sebep olarak kabul edilir (Guerra ve ark. 2018). Kataraktlar yeni doğanlarda gözlemlendiğinde doğuştan olarak sınıflandırılır.

Çalışmamızda, korneal lezyonu olan vakalarda bilateral katarakt tespit edildi. Bu durumu, görme yeteneğini sınırlandıran bilateral duruma ve hasta sahiplerinden alınan anamneze göre köpeğin baş bölgesi travması almış olabileceğine bağlıyoruz. Bilateral katarakt vakalarında kan şekeri düzeylerinin daha yüksek oluşu, diyabetik katarakt yönünde güçlü kanıtlar sağlamakta ve bu durumun hazır mama ile beslenme ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Matür katarakt seviyesinin yüksek olmasını, insipient ve matür kataraktların hasta sahibi tarafından geç fark edilmesine bağlamaktayız. Matür ve hipermatür katarakt evrelerinde lensin saydamlığını yitirmesi nedeniyle oftalmoskop ile yapılan muayenede refleks alınamamıştır. İnsipient katarakt evresinde korneal lezyona rastlanmaması ve tapetal refleksin varlığı lensin hala saydamlığını sürdürdüğünü işaret eder.

SONUÇ

Sonuç olarak, gözlemlenebilir lezyon olan köpek kataraktının biyo-belirteci olan yaşlanmayla ilişkili olduğu ve görülme sıklığının cins büyüklüğü ve beslenme şekli ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Orta yaş köpeklerin göz hastalıkları ve özellikle katarakt yönünden 3 ayda bir veteriner hekim kontrolünden geçirilmeleri tavsiye edilmektedir. Diyete bağlı gelişen katarakt olguları için, hazır mama firmalarının göz hastalıklarına yönelik özel diyet mama üretmeleri üzerinde önemle durulması gereken bir konudur. Hayvan sahiplerinin sahip oldukları köpeklerinin ırk özelliklerini bilmesi hastalığın erken teşhisi bakımından önemlidir. Ayrıca göz hastalıkları yönünden hasta sahiplerinin veteriner hekimler tarafından bilinçlendirilmesi göz ardı edilmemesi gereken bir husustur.

Etik Kurul Bilgileri: Etik izin: Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" Madde 8 (k) gereği HADYEK

iznine tabi değildir. AKU HADYEK 25/04/2013 tarih ve 49533702/320 numara ile izin almıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir.

Çıkar Çatışması: Yazar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Adkins EA, Hendrix DV.** Outcomes of dogs presented for cataract evaluation: a retrospective study. *J Am Ani Hospital Assoc.* 2005; 41(4): 235-240.
- Basher AW, Roberts SM.** Ocular manifestations of diabetes mellitus: diabetic cataracts in dogs. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 661-676.
- Baumworcel N, Soares AM, Helms G, Rei PR, Castro MCN.** Three hundred and three dogs with cataracts seen in Rio de Janeiro, Brazil. *Vet Ophthalmol* 2009; 12(5): 299-301.
- Beam S, Correa MT, Davidson MG.** A retrospective-cohort study on the development of cataracts in dogs with diabetes mellitus: 200 cases. *Vet Ophthalmol* 1999; 2: 169-172.
- Biros, DJ, Gelatt KN, Brooks DE, Kubilis PS, Andrew SE, Strubbe DT, Whigham HM.** Development of glaucoma after cataract surgery in dogs: 220 cases (1987–1998). *J Am Vet Med Assoc* 2000; 216(11): 1780-1786.
- Davidson MG, Nelms SR.** Diseases of the lens and cataract formation, In: *Veterinary Ophthalmology*, Ed; Gelatt KN, 3rd Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA. 1999; pp. 797-825.
- Davidson, MG.** Phacoemulsification and intraocular lens implantation: a study of surgical results in 182 dogs. *Prog Vet Comp Ophthalmol* 1991; 1: 233-238.
- Donzel E, Arti L, Chahory S.** Epidemiology and clinical presentation of canine cataracts in France: a retrospective study of 404 cases. *Vet Ophthalmol* 2017; 20(2): 131-139.
- Engle R, Spencer W.** *Lens.* In: *Ophthalmic Pathology*, Ed., Spencer W, WB Saunders, Philadelphia, 1996.
- Fischer C.** Geriatric ophthalmology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1989; 19: 103-123.
- Gelatt KN, MacKay EO.** Prevalence of primary breed-related cataracts in the dog in North America. *Vet Ophthalmol* 2005; 8: 101-111.
- Glover TD, Constantinescu GM.** Surgery for cataracts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997; 27: 1143-1175.
- Glover TD, Constantinescu GM.** Surgery for cataracts. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1997; 27: 1143-1175.
- Guerra, R, Cabeças R, Diaz J, Knott T, Freitas I, Vilhena H, Duarte S.** Cataracts in Labrador Retriever and Jack Russell Terrier From the United Kingdom: A Two-Year Retrospective Study. *Topics Compan Anim Med* 2018; 33(4): 109-113.
- Lim CC, Bakker SC, Waldner CL, Sandmeyer LS, Grahn BH.** Cataracts in 44 dogs (77 eyes): A comparison of outcomes for no treatment, topical medical management, or phacoemulsification with intraocular lens implantation. *The Can Vet J* 2011; 52(3): 283.
- Maggs D, Miller P, Ofri R.** *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology E-Book.* Elsevier Health Sciences, 2017.
- Moeller E, Blocker T, Esson D, Madsen R.** Postoperative glaucoma in the Labrador Retriever: incidence, risk factors, and visual outcome following routine phacoemulsification. *Vet Ophthalmol* 2011; 14(6): 385-394.
- Nelson RW.** *Diabetes Mellitus Veterinary Internal Medicine*, Ed; WB, Saunders Co, Philadelphia, 4th Ed., Nelson. 1995; pp: 1510-1537.
- Newbold GM, Kelch WJ, Chen T, Ward DA, Hendrix DV.** Phacoemulsification outcomes in Boston terriers as compared to non-Boston terriers: a retrospective study (2002–2015). *Vet Ophthalmol* 2018; 21(4): 353-361.
- Oberbauer AM, Hollingsworth SR, Belanger JM, Regan KR, Famula TR.** Inheritance of cataracts and primary lens luxation in Jack Russell Terriers. *Am J Vet Res* 2008; 69(2): 222-227.
- Ofri R.** *Lens.* In: *Slatter's Fundamentals of Veterinary Ophthalmology*, Ed; Maggs DJ, Miller PE, Ofri R, 4th Ed., Saunders Elsevier, St Louis. 2008; pp: 258–276.
- Park SA, Yi NY, Jeong MB, Kim WT, Kim SE, Chae JM, Seo KM.** Clinical manifestations of cataracts in small breed dogs. *Vet Ophthalmol* 2009; 12(4): 205-210.
- Rogen AJ, Moradi Rekabdarkolae H.** Retrospective review of cataract surgery outcomes in Miniature Schnauzers. *Vet Ophthalmol* 2020; 23(3): 552-559.
- Rubin L.** *Inherited Eye Diseases in Purebred Dogs.* Williams & Wilkins, Baltimore. 1989; pp: 230-232.
- Rubin LF, Flowers RD.** Inherited cataract in a family of standard poodles. *J Am Vet Med Assoc* 1972; 161:207-208.
- Sigle KJ, Nasisse MP.** Long-term complications after phacoemulsification for cataract removal in dogs: 172 cases (1995–2002). *J Am Vet Med Assoc* 2006; 228(1): 74-79.
- Urfer SR, Greer K, Wolf NS.** Age-related cataract in dogs: a biomarker for life span and its relation to body size. *Age* 2011; 33(3): 451-460.
- Wilkie DA, Gemensky-Metzler AJ, Colitz CMH, Bras ID, Kuonen VJ, Norris KN, Basham, C. R.** Canine cataracts, diabetes mellitus and spontaneous lens capsule rupture: a retrospective study of 18 dogs. *Vet Ophthalmol* 2006; 9(5): 328-334.
- Schaer M.** *Diabetes Mellitus.* In: *Clinical Medicine of the Dog & Cat.* Manson Publishing Ltd, London. 2003.
- Şaroğlu M.** *Kedi ve Köpek Göz Hastalıkları, Göz Göz İçi Basıncı ve Glaukoma,* Nobel Kitabevi Ltd, İstanbul. 2013; pp: 243.
- Williams DL, Heath MF, Wallis C.** Prevalence of canine cataract: preliminary results of a cross-sectional study. *Vet Ophthalmol* 2004; 7:29-35.

Comparison of the Pathomorphological and Immunohistochemical Findings of an Experimental Co-infection with Infectious Bronchitis Virus M-41 and *Bordetella Avium* in Chicks

Mehmet Fatih BOZKURT^{1*}, Günay ALÇIĞIR²

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 03100, Afyonkarahisar, Turkey

²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 06130, Ankara, Turkey

ABSTRACT

In this experimental study, our objective was to investigate the macroscopic, microscopic and immunohistochemical findings developed in the respiratory system due to the co-infection with infectious bronchitis virus (IBV) M-41 and the commensal *Bordetella avium* in the respiratory tract in 15-day-old female Brown-Nick chicks. In this study, a total of 70 non-SPF, healthy chicks were randomized into 4 groups. The chicks in Group 1 (n=20) were infected only with IBV-M41 strain; chicks in Group 2 (n=20) were infected with IBV-M41 and *B. avium*; chicks in Group 3 (n=20) were infected only given *B. avium*. Group 4 (n = 10) were given sterile physiological saline at the same dose and route. The administration of the strains was performed with an intranasal injection. On the 2nd-7th., 9th, 11th, 13th, 15th, and 18th days of the post-inoculation, 2 chicks from the experimental groups and 1 chick from the control group were sacrificed. In Group 1, the degenerative and inflammatory changes, which were observed in the 2nd day of infection, disappeared on the 15th day. In Group 2, we noticed bacterial colonies and mucous exudate containing heterophile leukocytes in the lumens of trachea and larynx. Starting from the 13th day, findings related to recovery e.g., in Group 1 were noticed. In the microscopical examination of the tissues by immunohistochemistry and immunofluorescent methods, we observed the antigenic distribution in the upper respiratory tract in Group 1 between the 2nd and 5th days and in Group 2 between the 2nd and 9th days. However, lungs were involved between the 5th and 11th days in Group 1 and between the 7th and 11th days in Group 2. In conclusion, we determined that the progress of findings was relatively milder in chicks primarily infected with IBV-M41 and the findings lasted longer in chicks co-infected with *B. avium* and IBV caused severe symptoms in chicks in case of co-infection.

Keywords: IBV-M41, *Bordetella avium* co-infection, experimental, pathology, chick.

Civcivlerde Enfeksiyöz Bronşitis Virusu M-41 Suşu ve *Bordetella Avium* ile Oluşturulan Deneysel Koenfeksiyonunda Patomorfolojik ve İmmunohistokimyasal Bulguların Karşılaştırılması

ÖZ

Bu deneysel çalışmada, enfeksiyöz bronşitis virusu (IBV) M-41 suşu ve solunum kanalı kommensali olan *Bordetella avium* 15 günlük Brown-Nick ırkı yumurtacı dişi civcivlere verilerek koenfeksiyon oluşturulmuş; solunum sisteminde gelişen makroskobik, mikroskobik ve immunohistokimyasal bulguların ortaya çıkarılması amaçlanmıştır. Çalışmada 70 adet non-SPF, sağlıklı civciv rastgele 4 farklı gruba ayrıldı. Grup 1'e (n=20) yalnız IBV-M41 suşu; Grup 2'ye (n=20) IBV-M41 suşu ve *B. avium*; Grup 3'e (n=20) yalnız *B. avium* nazal yoldan 0.1 ml verilerek civcivler enfekte edildi. Kontrol grubu olan Grup 4'teki hayvanlara (n=10) ise aynı doz ve yoldan yalnızca steril fizyolojik tuzlu su verildi. Enfeksiyonun 2., 7., 9., 11., 13., 15. ve 18. postinokulasyon günlerinde her bir gün için deney gruplarından 2; kontrol grubundan 1 hayvan alınarak ötenazileri gerçekleştirildi. Grup 1'de enfeksiyonun 2. gününde trakea ve larinkste görülen dejeneratif ve yangısal değişiklikler 15. günde ortadan kalkmıştı. Grup 2'deki hayvanlarda ilk gruba ek olarak trakea ve larinks lümenlerinde heterofil lökositler içeren müköz eksudat ile bakteri kolonileri de fark edildi. 13. günden sonra öncesine benzer şekilde iyileşmeye yönelik bulgular dikkati çekti. Grup 3 ve 4' de herhangi bir bulguya rastlanmadı. İmmunohistokimya ve immunofloresan yöntemleriyle dokularda antijenik dağılımın Grup-1'de 2-5.; Grup-2'de 2-9. günlerde üst solunum kanalındayken, Grup-1'de 5-11.; Grup-2'de 7-11. günlerde akciğerde lokalize olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak IBV ile primer enfekte civcivlerde bulguların daha hafif seyrettiği, *B. avium*'la koenfeksiyon civcivlerde bulguların daha şiddetli ve uzun sürdüğü, IBV'nin koenfeksiyonla daha şiddetli bulgular gösterdiği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: IBV-M41, *Bordetella avium* ko-enfeksiyon, deneysel, patoloji, civciv

To cite this article: Bozkurt, M.F. Alçıgır, G. Comparison of the Pathomorphological and Immunohistochemical Findings of an Experimental Co-infection with Infectious Bronchitis Virus M-41 and *Bordetella Avium* in Chicks. Kocatepe Vet J. (2021):14(1):137-148

Submission: 23.11.2020 Accepted: 26.02.2021 Published Online: 28.02.2021

ORCID ID; MFB: 0000-0002-1669-0988, GA: 0000-0002-3001-6420

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

INTRODUCTION

Infectious bronchitis (IB) disease, caused by the highly contagious Infectious Bronchitis Virus (IBV) in chickens, has an acute course and serious epidemics in animals of almost all ages. This virus leads to lesions not only in the respiratory tract but also in the urogenital tract in chicks (Cavanagh and Gelb 2008, Liu et al 2015). Although it does not usually end up with death, it causes important losses depending on retarded growth, reduced egg yield, and egg quality. IBV is classified in the Coronaviridae family under the Gammacoronavirus genus (Cavanagh and Naqi 2003, King et al 2012). Until today, more than 26 serotypes and 1652 strains (For example T, Holland, Connecticut, Arkansas strains, 793/B, IB2, H120, IBVPR-05, nephropathogenicIBvar2 strain) were determined. The course of the disease and the involvement of the organs depends on the strains causing the infection. The renal symptoms are usually mild in strains causing respiratory tract infections, while the findings related to the respiratory system are mild or absent at all in infections caused by the nephropathogenic strains (Mcmartin 1993, Cavanagh and Naqi 2003, Benyeda et al 2010, King et al 2012, Fernando et al 2013, Liu et al 2015, Valastro et al 2016). The antigenic properties of the Massachusetts strain (M-41), which is particularly active in the respiratory system, are currently considered as the prototype (Mcmartin 1993, Cavanagh 2003).

The experimental infections caused by the IBV Massachusetts serotype H-13 strain showed that chicks in older ages were also affected and exudate changing from seromucous to fibrinous composition emerged in the nose, trachea, and air sacs along with the urinary system findings (Butcher 1990).

In IBV infections, the lesions are relatively more severe in the presence of secondary or mixed infections (Kinde et al 1991). Co-infections are caused especially by *Escherichia coli* and *Mycoplasma gallisepticum*. Co-infections of IBV and *E. coli* cause exudates changing between serous and caseous character in the nose and sinuses, petechial hemorrhage in the trachea and bronchial mucosa and sometimes severe findings in the air sacs. Fibrin accumulation in the abdominal air sac is one of these severe changes (Smith et al 1985, Schulz 1991, Jackwood and Wit 2013, Bwala et al 2018).

Bordetella avium is a Gram-negative, mobile, and non-fermentative coccobacillus. Bordetellosis is a very contagious upper respiratory tract disease caused by *B. avium* (Jackwood and Saif 2003). This disease is characterized by eye-nose discharge, sneezing, respiratory distress (dyspnea), tracheal collapse, and weight loss (Arp and Cheville 1984). The infection caused by *B. avium* in young turkeys characterized by upper respiratory tract lesions is called turkey coryza (*B. avium* rhinotracheitis) (Jackwood and Saif 2003). Flocks, particularly quails are sensitive to *B. avium* in changing levels. This pathogen that can cause

opportunistic infections in chicken (Jackwood et al 1995) is activated by the primary infections affecting the respiratory system or other factors. For example, bordetellosis could be developed after the exposure of irritating agents like ammonia, and vaccination with infectious bronchitis (IB) or Newcastle disease. *B. avium*, which is an opportunistic and commensal pathogen, may cause severe infections when it is concomitant with infectious bronchitis disease (Blackall and Doheny 1987, Jackwood et al 1995, Odubgo et al 2006).

Our objective in this study was to describe the mixed infections with Massachusetts (M-41) strain, which is considered as the reference of IBV, and the opportunistic pathogen *B. avium* seen in the flocks, to compare the positive and negative control groups in order to investigate the course of primary IB in chicks and to investigate the effects of *B. avium* on this condition and consequently to elucidate the pathogenesis of IB disease.

MATERIALS AND METHODS

Supply of the experimental animals and legal permissions

This study was conducted with seventy healthy 15-day-old Brown Nick female layer chicks that were supplied by a disease-free poultry company. The study was approved by the Local Ethics Committee of the Veterinary Faculty at Ankara University dated May 23 2006 and numbered 2006/23.

Inoculum Implementation

In this study, we used IBV-M41 strain with a 50% embryo infectious dose (EID₅₀) (106.4/ml) in SPF eggs according to Reed and Muench (1939) method, which were obtained from the Manisa Poultry Diseases Research and Vaccine Production Institute. The standard *B. avium* strain used in this study was obtained from Dr. Y.M. Saif (Food Animal Health Research Program Wooster, Ohio, USA) and this standard *B. avium* strain was cultivated in the sheep blood agar under aerobic conditions at 37°C for 48 hours. The total count method for live bacteria (Bilgehan, 2004) was adjusted to a concentration of 107CFU/ml in the Pertussis Reference Laboratory at Refik Saydam Hıfzısıhha Center.

Hyperimmune Serum

The rabbit anti-IBV-M41 strain hyperimmune serum (1/32 HI titration), which was obtained from the Manisa Poultry Diseases Research and Vaccine Production Institute, was used for the immunohistochemical examinations.

Experiment Groups and Procedure

After the chicks became 15 days old, they were divided into groups according to the single or combined inoculation of the strains and they were infected with inoculums as described in the literature (Arp and

Cheville 1984, Nakamura et al 1996, Jackwood and Saif, 2003). Group 1: Twenty 15-day-old chick were inoculated through the intranasal route only with IBV-M41 strain (EID50 106.4/ml; 0.1ml). Group 2: Twenty 15-day-old chicks were inoculated through the intranasal route with IBV-M41 strain (EID50 106.4/ml; 0.1ml) like in Group 1 and *B. avium* (107 CFU/ml; 0.1ml). Group 3: Twenty 15-day-old chicks were inoculated through the intranasal route only with *B. avium* (107 CFU/ml; 0.1ml). Group 4: Ten 15-day-old chicks were reserved in the control group and all received 0.1 ml saline solution through the intranasal route. On the 15th day of the experiment, blood samples were taken from 5 chicks from each group and hemagglutination-inhibition (HI) test was carried out and the presence of maternal antibody for IBV-M41 strain in the blood of chicks was examined. None of the chicks died during the infection period.

Necropsy Assessment

Two of the chicks were randomly chosen from each group on the 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th, 7th, 9th, 11th, 13th, 15th, and 18th days, were anesthetized with 5.5-11mg/kg pentothal (Thiopental sodium pentothal, I.E. Ulagay Ilaç Sanayii Turk A.Ş. Topkapı, Istanbul, Turkey) and sacrificed with cervical dislocation via a single manipulation of the dorsal cervical region. Systemic necropsy was carried out following euthanasia.

Histopathological Examinations

After the necropsy, tissue samples were taken from all organs (mainly nose, larynx, air sacs, trachea, and lungs) and referred to histopathological examination. The obtained samples were fixed in a 10% neutral formalin solution (pH 7.2-7.4). Following routine tissue care, 4-5 micron thick sections were cut with a microtome from the prepared paraffin blocks and stained with the hematoxylin-eosin (HE) method (Luna, 1968).

Antigenic Determination in Tissue

Indirect immunoperoxidase method

IB virus antigens were detected in the tissue with the avidin-biotin-peroxidase complex peroxidase (ABC-P) method. For this purpose, 4-5 micron thick sections that are cut from the routinely prepared paraffin blocks were transferred on the adhesive glass slides. Deparaffinized and rehydrated sections were washed with phosphate-buffered saline (PBS). Then the sections inserted into the humidity cabinet and kept in the 0.1% trypsin solution at 37°C for 30 minutes to unveil the antigenic structures. Samples were washed in PBS three times for 5 minutes. Then they were placed in the 3% hydrogen peroxidase solution for reduce the endogenous peroxidase activity. The tissues were washed again with PBS. Then they were processed with normal goat serum at 37°C for 20 minutes to prevent the non-specific antibody reactions. Afterwards, the serum was removed and

rabbit anti-IBV primary antibody (diluted at 1/16) was dripped without washing. The samples were incubated in the incubator at 37°C for 30 minutes. Then the samples were washed with PBS 3 times for 5 minutes each. Following this procedure, biotinized goat anti-rabbit secondary antibody (Rabbit ExtrAvidin Peroxidase Kit, Sigma-EXTRA3) was dripped on the tissues and incubated in the incubator at 37°C for 20 minutes. Then, the samples were washed with PBS and incubated in the incubator at 37°C for 20 minutes following the dripping of streptavidin-peroxidase complex (Rabbit ExtrAvidin Peroxidase Kit, Sigma-EXTRA3) on the samples. Following this final incubation, the samples were washed again with PBS and processed with substrate-chromogen (AEC chromogen kit, Sigma AEC-101) to activate the reaction. The reaction in the tissue sections was controlled at room temperature under the microscope for 1-10 minutes. After the emergence of the desired color, the reaction was terminated under distilled water. Mayer's hematoxylin was applied to the sections for 30 seconds to stain the background. At the end of the process, the glass slides were covered with a lamella via a water-based adhesive. In the control sections, PBS was used instead of the primary antibody and the following processes were carried out according to the abovementioned procedure.

Indirect immunofluorescence (IF) method

The tissues obtained from the sacrificed chicks were prepared for staining with the Sainte-Marie technique (1962). 4-5mm-thick tissues, which were obtained from the organs of the respiratory system for this purpose, were kept in a 96% ethyl alcohol solution at 4°C for one hour. The tissues were cut at 2-3mm thickness and placed in the cassettes. All cassettes were processed as described in Sainte-Marie technique (1962) and tissues were embedded on paraffin blocks. The paraffin blocks were stored in the refrigerator until the cutting process with the microtome. The sections that were transferred on the glass slides were deparaffinized and rehydrated with xylene and alcohol respectively at 4°C before the staining with the immunofluorescence method. The sections were then transferred into PBS and prepared for the staining with the immunofluorescence method. The sections, which were placed in the humidity cabinet, were incubated with rabbit anti-IBV primary antibody (diluted 1/16) in the incubator at 37°C for 30 minutes. After the incubation, the samples were washed with PBS three times for 5 minutes each. Then goat anti-rabbit serum (conjugate, Sigma- F 0382) (diluted 1/16) bound with fluorescein isothiocyanate (FITC) was dripped on the tissue sections. The samples were transferred again into the incubator at the same temperature for the same duration. After the second incubation, 1 drop of 10% glycerinated PBS was applied onto the sections and then they were covered with a lamella. The edges of the lamella were coated with paraffin and the

samples were stored in the refrigerator until the examination time.

Photomicrography

The examination of the fields stained with the histopathological and immunoperoxidase method was done under the DM-4000B digital light microscope and the pictures were taken with a Leica DFC-280 camera attachment. Regarding the immunofluorescence method, the examination of the sections was performed with a fluorescence microscope (overhead lighting) (Leitz Laborlux D, BP 450-490 wavelength filter system, mercury vapor, darkfield microscope).

FINDINGS

Macroscopic Findings

In Group 1, in the first days of the infection, the mucosa of the nose, larynx, trachea, and major bronchi were mildly hyperemic, edematous and coated with serous exudate. Mild opacity increasing in the air sacs and hyperemia in the lungs were observed between the 4th and 9th days of infection. No significant macroscopic finding was noticed between the 13th and 15th days. In Group 2, the changes described above for Group 1 were mild between the 2nd and 4th days but became severe between the 5th and 13th days. Petechial hemorrhage in the sinuses, larynx, and trachea was observed along with mucoid exudate in the nose. An adenomatous appearance was noticed. The findings regressed after the 13th day and disappeared on the 18th day. There were no noticeable findings in Group 3 (Figure-1 and Figure-2).

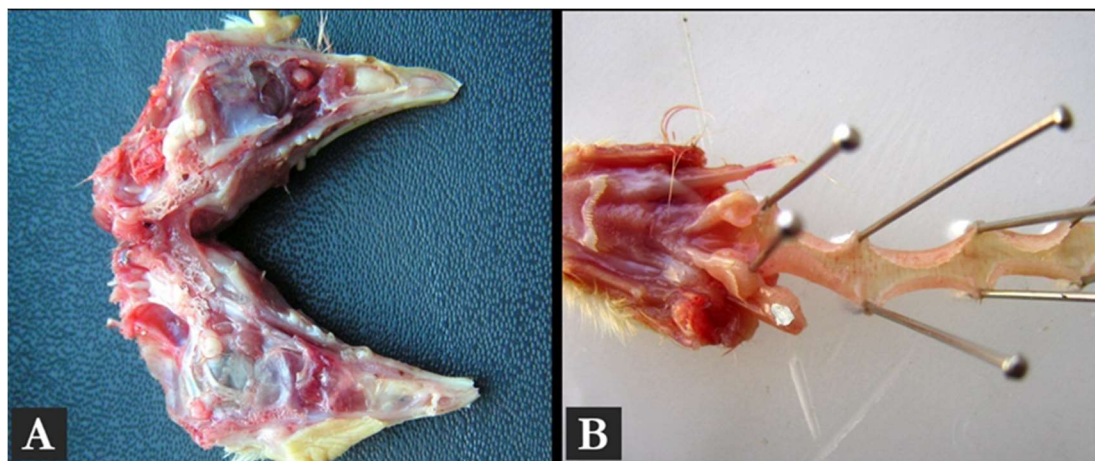


Figure 1: Group 1; hyperemia and edema in the mucosa of the nose (A) and larynx and trachea (B) on the 5th day of infection.

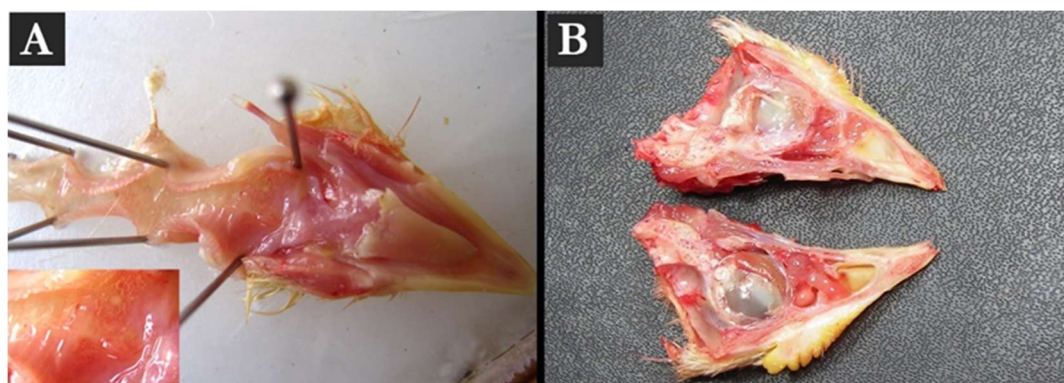


Figure 2: Group 2; severe hyperemia in the nasal mucosa (A) and seromucous exudate in the laryngeal and tracheal mucosa (B) (B small frame) on the 5th day of infection.

Histopathological Findings

Findings In Group 1, there were lymphocyte infiltration, hemorrhage and focal lymphoid foci in the mucosa. In group 2, they were in the form of cell debris, lymphoid cell infiltration, dense heterophile leukocyte infiltrations and hemorrhages on the mucous membranes of the organs. All findings related

to the nasal mucosa, larynx, and trachea and partially lungs observed in Group 1 and 2 were summarized in Table 1 according to the groups (Figure-3). We did not observe any microscopic finding in Group 3 and Group 4 (the control group), which was consistent with the macroscopic examination.

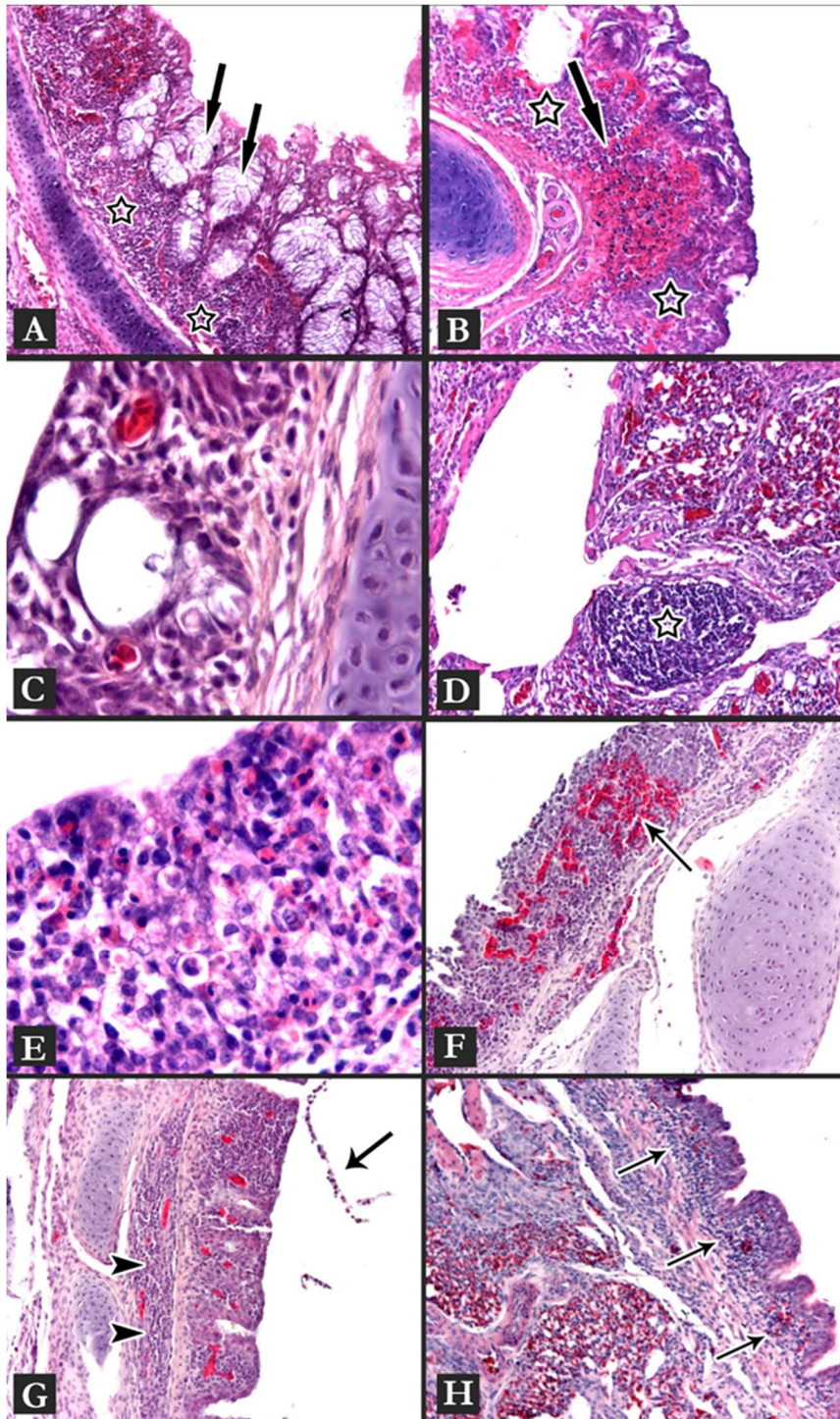


Figure-3. Group 1: (A) glands filled with secretion on the 5th day (arrows) and lymphocyte infiltration between the glands (stars), 10x. (B) diffuse hemorrhage in the propria (arrow) and lymphoid cell infiltration (stars) on the 5th day. 10x. (C) cystic structures in the epithelium on the 5th day, 40x. (D) lymphocytic focus in the interstitium on the 9th day (star), 10x. Group 2: (E) Diffuse heterophiles close to the lumen in the propria on 5th day, 40x; (F) lymphoid cell infiltration and hemorrhage in the propria on the 5th day (arrow), 10x. (G) heterophile leukocytes and ep fuse lymphoid cells in the propria and submucosa (arrowheads), 10x. (H) diffuse lymphoid cells (arrows) and heterophile leukocytes around the primary bronchus on the 3rd day, 10x.

Table-1. Histopathological findings according to degree and distribution at tissues of the experimental groups*.

Experimental Groups	<i>Group I-(IBV-M41)</i>						<i>Group II-(IBV-B.avium)</i>					
	Nasal mucosa	Larynx	Trachea	Lungs	Air sacs	Nasal mucosa	Larynx	Trachea	Lungs	Air sacs		
2 DPI	1,2,3	1,2,3,8	2,5,8	1,4	1,8	1,5,8	1,5,8	1,2,5,8	1,5,9	8		
3 DPI	5,6,7	1,2,3,8	2,5,6,8	1,4	1,8	1,5,8	1,4,5,8	1,2,5,8	6,8	8		
4 DPI	1,2,8	2,3,7,8	8	2,3,8	1,8	2,5,6,8	1,6,8,9	1,2,6,8,9	6,8	8		
5 DPI	1,8	2,3,7,8	2,3,4,5	2,3,8	1,8	1,2,6,8	1,6,8,9	1,2,6,8,9	1,6	8		
6 DPI	1,5,7,8	3,8	2,3,4,5	5,8	1,8	1,2,5,6,8	1,6,8,9	1,2,6,8,9	1,6	8		
7 DPI	8,9	8	8	5,8	1,8	1,2,5,6,8	1,6,8,9	1,2,6,8,9	6,9	8		
9 DPI	1,7	8	8,9	9,10	1,8	5,6,8	5,9	1,2,6,8,9	6,9	8		
11 DPI	5,8	8,9	8,9	8,9	1,8	5,6,8	9	3,4,6	5,6,8	8		
13 DPI	7	0	8,9	8,9	0	5,6,8	9	3,4,8	5,6,8	8		
15 DPI	8,9	0	9	8,9	0	8	8,9	3,4,8	0	0		
18 DPI	0	0	0	0	0	8,9	8,9,10	4,8,9	0	0		

Tablekey finding (0), Hyperemia and edema (1), Degeneration and desquamation (2), Dilatation and cysts in glands (3), Secretion in glands and Goblet cells (4), Heterophil leucocyte infiltration (5), Mononuclear cell infiltration (6), Diffuse lymphocytic infiltration (7), Focal lymphocytic infiltration (8), Regeneration and hyperplasia (9), Reparation including fibrosis (10).

*Since no lesions were seen in groups 3 and 4, they were not included in the table.

Immunohistochemical Findings

In Group 1, immunoperoxidase staining displayed reddish-brown colored granular or diffuse immunopositive viral antigens in the mucosa of the glands and the nose, larynx, and trachea in different extents between the 2nd and 7th days of infection. A similar but less prominent immunopositivity was determined in the epithelial cytoplasm of the primary secondary bronchi in the lungs between the 5th and 7th days. Immunofluorescence staining revealed shiny yellowish-green colored IF-positive viral antigens with a granular structure on a pale green ground in the

epithelium of the nose, larynx, trachea, and primary/secondary bronchi between the 2th and 7th days. Furthermore, diffuse IF-positively viral antigens were determined in the glandular epithelia opening to the mucosa of these organs (Figure-4).

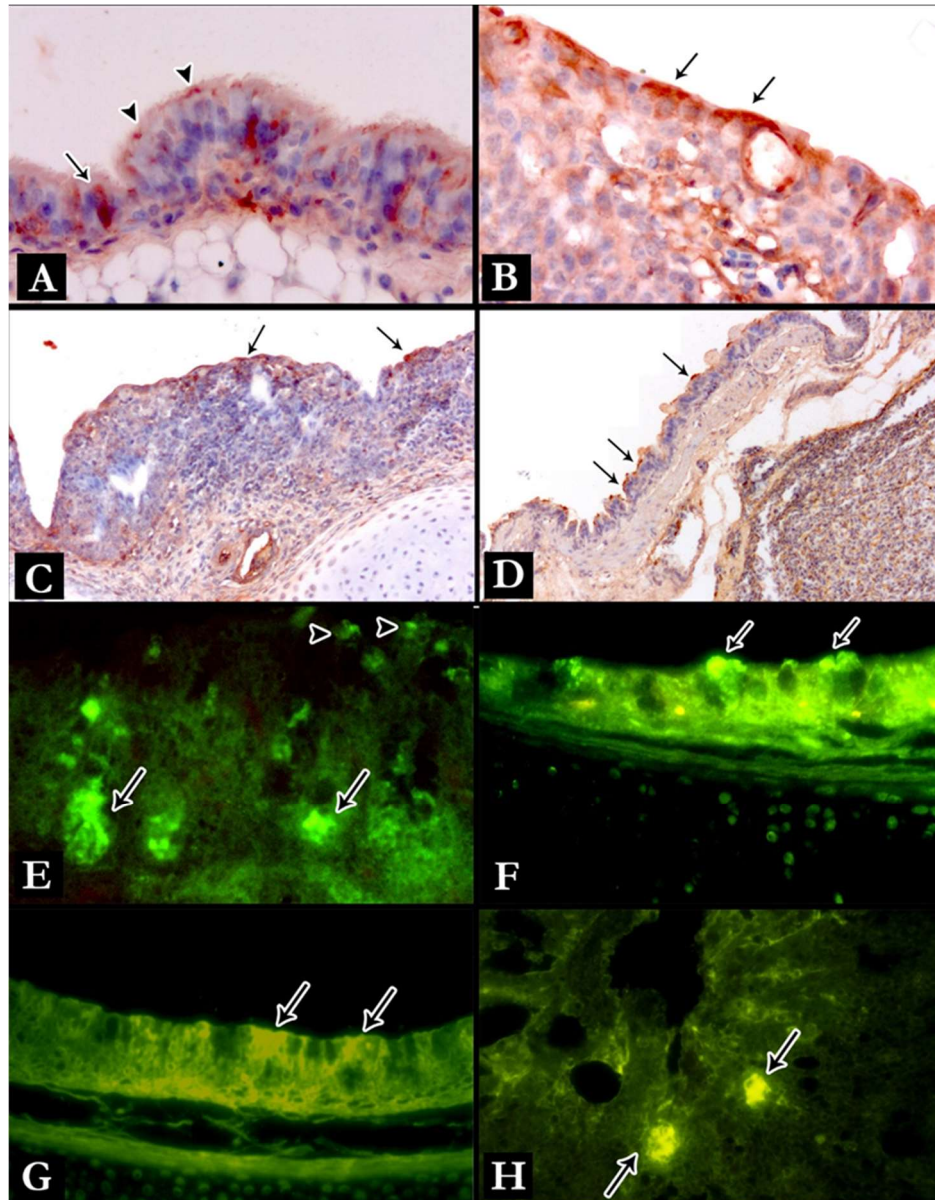


Figure-4. IB infection: ABC-peroxidase staining for the IB virus (A-D) and IB infection: Immunofluorescence staining for the IB virus (E-H). A: granular (arrowheads) or diffuse (arrow) IP-positive viral antigens in the nasal mucosa epithelium on the 2nd day, 40x. B: diffuse (arrows) IP-positive viral antigens in the laryngeal mucosa epithelium on the 3rd day, 40x. C: IP-positive viral antigens (arrows) in the laryngeal mucosa epithelium on the 5th day, 20x. D: IP-positive viral antigens (arrows) in the primary bronchial epithelium in the lungs on the 5th day, 10x. E: IF-positive viral antigens in the gland epithelium (arrows) and the nasal mucosa epithelium (arrowheads) on the 2nd day, 30x. F: IF-positive viral antigens in the tracheal mucosa epithelium (arrows) on the 2nd day, 30x. G: Diffuse IF-positive viral antigens in the tracheal mucosa epithelium on the 5th day (arrows), 30x. H: IF-positive viral antigens in the primary bronchial glands in the lungs on the 5th day (arrows), 25x.

In Group 2, in chicks with mixed infection caused by IBV and *B. avium*, IP staining showed reddish-brown granular or diffuse immunopositive viral antigens in various extents in the cytoplasm of the mucosa and gland epithelium of the nose, larynx, and trachea after the inoculation of IBV between the 2nd and 11th days. While the staining was weak and granular between the 2nd and 4th days, denser and more diffuse immunopositive fields in various sizes were noticed in the partially destructed tracheal mucosa epithelium between 5th and 9th days. Furthermore, we

determined granular immunopositive viral antigens in the laryngeal mucosa epithelium between the 5th and 9th days and in the epithelial cytoplasm of the primary or secondary bronchi between the 7th and 11th days. In Group 2, the IF staining showed shiny yellowish-green colored granular IF-positive viral antigens on a pale green ground in the epithelium of the nose, larynx, trachea and primary and secondary bronchi between the 2nd and 9th days. We observed also diffuse IF-positive viral antigens in the glandular epithelium of these organs opening to the mucosa (Figure-5).

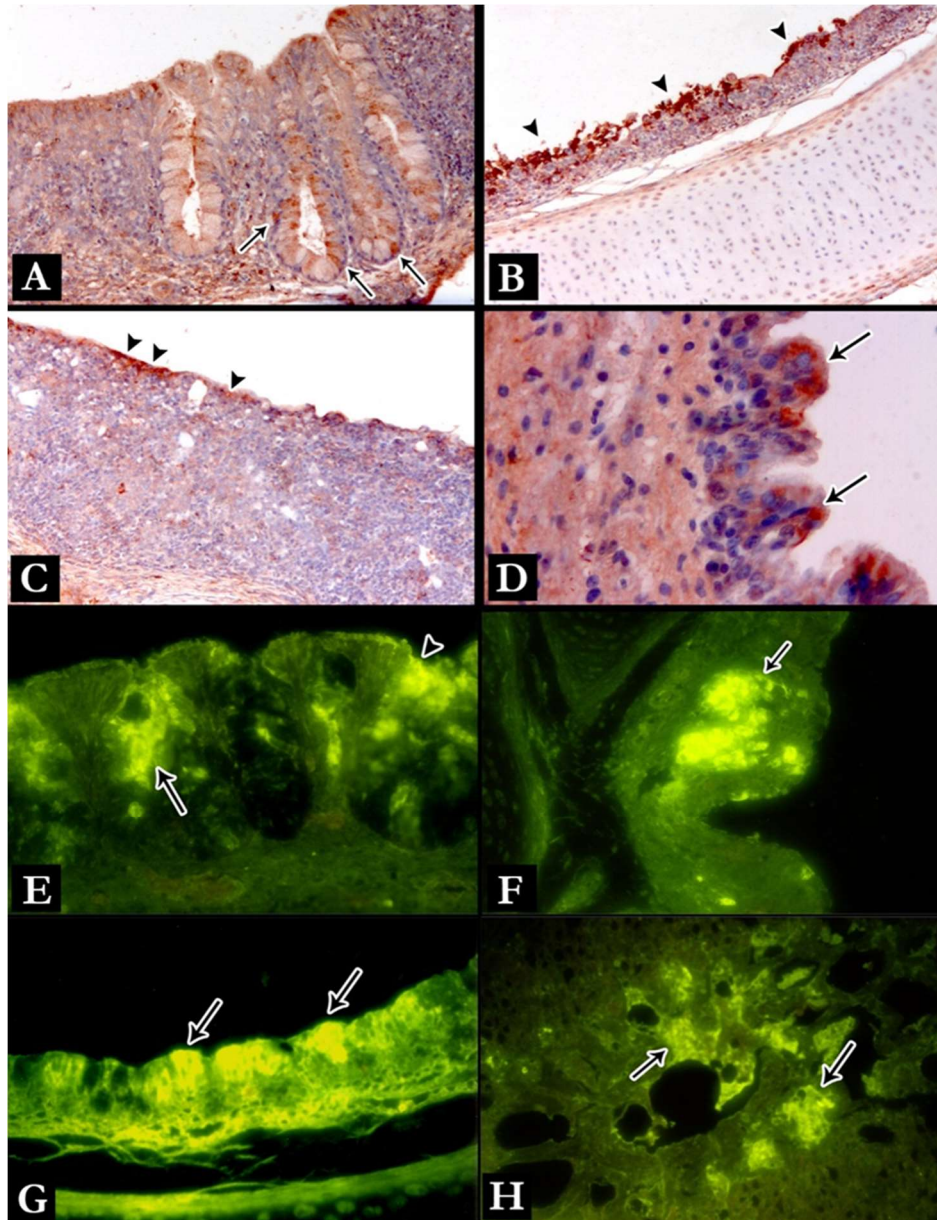


Figure-5. Mixed infection caused by IBV and *B. avium*: ABC-peroxidase staining for the IB virus. A: Viral antigens in the gland epithelium of the nasal mucosa on the 4th day, 20x. B: Viral antigens with diffuse distribution (arrows) in the partially intact tracheal mucosa epithelium on the 5th day, 10x. C: Granular viral antigens (arrowheads) in the laryngeal mucosa epithelium on the 7th day, 10x. D: Viral antigens in the some parts of the epithelium of the primary bronchus in the lungs on the 11th day, 40x. Mixed infection caused by IBV and *B. avium*: Immunofluorescence staining for the IB virus. E: IF-positive viral antigens in the gland epithelium (arrow) and mucosa epithelium (arrowhead) of the nose on the 4th day, 30x. F: IF-positive viral antigens in the laryngeal glands (arrow) on the 5th day, 30x. G: Diffuse IF-positive viral antigens in the tracheal mucosa epithelium (arrows) on the 5th day, 30x. H: IF-positive viral antigens in the glands of the primary bronchi on the 9th day, 25x.

DISCUSSION

IBV is a virus that causes respiratory system problems in chickens at every age and may lead to morbidities and mortality (Cavanagh and Naqi 2003). In this study conducted on non-SPF chicks, the respiratory system of the neonatal chicks exhibited different responses with *Bordetella avium*, which is an obligate

commensal, due to the immune system deficiency. More severe reactions were usually observed in co-infections. It was determined that co-infection affects significantly and diffusely the lower respiratory tract along with the upper respiratory tract. In addition, the comparison of the changes in the antigenic distribution of the agents showed that regenerative processes were prolonged in all parts of the respiratory system in the animals inoculated with both M-41 and *B. avium* compared to the animals inoculated only with M-14 strain.

The studies focused only on IBV, were usually conducted with SPF chicks (Purcell and McFerran, 1972, Smith et al 1985, Nakamura and al 1991, Raj and Jones 1997) and there was no study conducted with non-SPF chickens. Several studies reported that *B. avium* was mainly responsible for turkey coryza (Jackwood and Saif 2003) and did not directly lead to infection in healthy chickens (Montgomery et al 1983, Jackwood et al 1995) and participated mostly in infections caused by other pathogenic bacteria and viruses (Simmons et al 1978, Montgomery et al 1983). We did not find any other experimental study focused on both IBV and *B. avium*, except for two studies, in which the IB vaccine was investigated (Montgomery et al 1983, Jackwood et al 1995). Thus, in this study, we investigated the clinical, macroscopic, and microscopic findings of the infection models created with the intranasal inoculation of IBV-M41 strain and *B. avium* in the 15-day-old commercial, layer chicks in four separate groups and tried to elucidate the pathogenesis. It was demonstrated that the macroscopic findings of infectious bronchitis in the respiratory system became prominent between the 2nd and 9th days and seromucous exudate developed in the laryngeal, tracheal, and nasal mucosa in these days along with edema and hyperemia (Purcell and McFerran 1972, Purcell et al 1976). It was also reported that non-glossy appearance in the air sacs and local hyperemia in the lungs might accompany these macroscopic findings (Purcell and McFerran 1972, Raj and Jones 1997). In our study, the prominent findings observed in Group 1 between the 4th and 9th days were similar to the findings reported in the literature. The findings were prominent in Group between 5th and 15th days and with the difference of Group 1, hemorrhage in the nasal mucosa and a more mucoid exudate were observed in the nasal cavity. These findings were consistent with the findings of the bordetellosis studies, namely hyperemia in the nasal and tracheal mucosa lasting approx. 2 weeks and the seromucous exudate seen in the cavities of these organs (Arp and Cheville 1984, Van Alstine and Arp 1988, Jackwood et al 1995). However, the findings related to the collapse due to the softening of the tracheal cartilage (Arp and Cheville 1984, Van Alstine and Hofstad 1985), which was reported for bordetellosis, was not encountered in this group.

The investigators focused particularly on the respiratory system in IB disease and mentioned that lesions were localized mainly in the trachea but also seen in the nose, lung, and air sacs (Garside 1965, Purcell and McFerran 1972, Goryo et al 1984, Nakamura et al 1991, Raj and Jones 1997, Matyhjis et al 2003). The observation of severe findings in both groups in the nose, larynx, trachea, and lungs and air sacs of 10 chicks confirmed this suggestion. In our study, in Group 1, the microscopic nasal lesions were observed in two periods. In the first period (between the 3rd and 9th days), the characteristics of acute rhinitis were presented mainly with epithelial

degeneration-regeneration and lymphoid cells in the nasal mucosa. In the second period (between the 9th and 15th days), accumulated lymphoid cells were observed in follicles in the propria mucosa and full regeneration in the mucosa epithelium. In Group 2, a lymphoid cell infiltration developed between the 3rd and 6th days after the IBV inoculation. Heterophilic cells jointed these cells and an appearance consistent with rhinitis characterized by the descent of these cells to the maxillary salivary glands developed. In the last period between the 13th day and the end of the experiment, the findings were similar to the previous group. Lymphoid cell foci and epithelial regeneration dominated again the picture. In our study, the findings of Group 1 were consistent with the findings reported by Purcell and McFerran (1972). However, the findings in Group 2, heterophile leukocyte infiltration and prolonged acute infection period were different from the findings observed in IB. These findings were consistent with the classical findings of bordetellosis (Simmons et al 1978, Saif et al 1980).

In studies focused on the infectious bronchitis virus strains, which are active on the respiratory system, the trachea was the main target of research (Purcell and McFerran 1972, Purcell et al 1976, Ducatelle et al 1984, Nakamura et al 1996, Chousalkar et al 2007). In this study, two days after the inoculation of IBV to the trachea and larynx, findings characterized by the loss of cilium in the epithelial cells, hydropic degeneration, hyperemia in the propria, and mild lymphoid cell infiltration emerged. In the following days, microscopic bleedings, diffuse lymphoid cell infiltration due to the mucosal thickening, and thinning in the epithelium were added to the existing findings and this picture continued until the 6th day. Then the findings started to regress. The epithelial cells, which had been flattened, regained their prismatic structure. Cilia re-appeared. Dense lymphoid cells diffusely distributed in the propria either gradually disappeared or formed follicle-like groups. On the 15th day, the mucosa re-gained almost completely its normal appearance. However, in Group 2 compared to Group 1, a more severe and prolonged inflammatory process was observed in the trachea and larynx between the 2nd and 13th days. In addition to the Group 1 findings; we observed mucus in the lumen and exudate consisting of heterophile leukocytes between the 7th and 11th days, bacteria colonies attached to the epithelium between 5th and 7th days, infiltration of heterophile leukocytes and diffuse lymphoid cells close to the lumen between the 5th and 13th days, and hyperplasia (up to 8-12 times) in the trachea between the 9th and 13th days, in the epithelial cells of the mucosa between the 3rd and 4th days. The findings observed in Group 1 were comparable to the findings reported by Garside (1965). In Group 2, an increase in the epithelial regeneration and inflammatory reactions as a response to the destruction caused by *B. avium* were observed.

Some authors (Purcell and McFerran 1972, Nakamura et al 1996, Raj and Jones 1997) reported hyperplasia up to 4-5 times in the epithelial cells two days after the IBV infection. Firat (1995) related this multilayered appearance to the dense lymphoid infiltration under the mucosa epithelium and reported that they took the appearance of a stratified squamous epithelium as a result of side by side and one under the other arrangement of the epithelial cells. In this study, in Group 2, epithelial hyperplasia was prominent between the 9th and 13th days in 8-12 layers and these findings were interpreted as a reaction related to the delayed recovery due to the addition of *B. avium* to IB infection. The bacterial colonies, exudate in the lumen, and the heterophile leukocyte infiltration confirmed that *B. avium* participated in the infection. The delay of recovery about 1 one week was also interpreted in favor of the secondary infection. Besides, these findings were consistent with the microscopic findings suggested for bordetellosis in turkeys (Arp and Cheville 1984, Van Alstine and Hofstad 1985).

It was reported that infectious bronchitis had a milder course in the lungs compared to the organs of the upper respiratory system (Purcell and McFerran 1972, Pohl 1974, McMartin 1993, Nakamura et al 1996, Raj and Jones 1997, Cavanagh and Naqi 2003). Likewise, bordetellosis cause also mainly lesions in the upper respiratory tract (Van Alstine and Hofstad 1985, Lister and Alexander 1986, Jackwood and Saif 2003). In our study, in both Group 1 and 2, the pulmonary findings were milder compared to the findings in the upper respiratory tract. In Group 1, hyperplasia that emerged in BALT two days after the inoculation worsened over the course of the experiment and obstructed almost the bronchial lumen between the 7th and 9th days. We noticed that the cilia of the epithelial cells in the secondary and primary bronchi became partly invisible after the 4th day and the lymphocytes located in the periphery of the lymphoid tissue spread towards the interstitium and formed central foci. In Group 2, non-dense heterophile leukocytes and hemorrhage were added to the similar lesions between the 5th and 7th days and heterophile and mucoid lesions in the lumens of the primary bronchi between the 13th and 15th days. These recorded findings were consistent with the findings encountered in both diseases. In this study, mixed infections with either IBV or *E. coli* (Gross 1958, Gross 1961, Fabricant and Levine 1962, Purcell and McFerran 1972, Dwars et al 2009) or air sac inflammation related to bordetellosis (Van Alstine and Arp 1987, El-Sukhon et al 2002) were encountered in Group 1 and Group 2 in 10 animals in the form of hyperemia and perivascular lymphoid cell infiltration. The immunohistochemical techniques are important for the diagnosis but also has a critical role in the determination of the pathogenesis during the infection period and the localization of the agent in the tissue (Chong and Apostolov 1982, Ambali and Jones 1990, Janse et al 1994, Chen and Itakura 1997). Owen et al. (1991) conducted a study on day-old chickens with IF

and IP methods and reported that they could detect the agent in the tracheal epithelium, macrophages, and epithelial cells spilled into the lumen until 10th day after the inoculation. In a study conducted with day-old SPF chicks, after the inoculation, the agent was determined in the tracheal mucosa epithelium until the 11th day and in the lungs until the 7th day (Janse et al 1994). In another study, which was conducted with 10-day and 21-day old SPF chicks from two different lines of the RIR race (C and 15I), the authors detected IBV antigen in the mucosa epithelium of the trachea until 7th day in the 10-day-old C-line chicks; until 5th day in the 21-day-old C-line chicks; until 12th day in the 10-day-old 15I line chicks; and until 9th day in the 21-day-old 15I line chicks with the IP method (Nakamura et al 1991). Dwars et al (2009) detected viral antigens in the trachea in 28-day-old commercial chicks until 4th day after the IB virus inoculation. In our study, in Group 1, we detected viral antigen in the nose, larynx, trachea, and lungs in 15-day-old chicks with both IP and IF methods between the 2nd and 7th days and in light of these findings we believed that infection might have a different course in SPF and common animals and particularly age and racial sensitivity might have a role in this context. In Group 2, in which both agents (IBV and *B. avium*) were administered, the prolongation of antigen positivity performed with IP and IF methods until 11th day was associated with the effects of the secondary infection caused by *B. avium*. Indeed, in another study conducted on 14-day-old chicks infected with IBV and Infectious Bursal Disease Virus (IBDV), the virus was detected in the tracheal epithelium and gland epithelium until 6th day in the group infected only with IBV and this period was prolonged to 13thday in the group with additional IBDV inoculation (Chen and Itakura 1997).

In conclusion, the findings of this study pointed to increased morbidity in infected coops, as the IBV infection, which does not have high mortality in chicken, led more diffuse lesions without causing mortality in non-SPF chicks alone or in combination with an opportunistic agent like *B. avium*. We consider that serious yield loss and economic loss may emerge due to this disease, which can affect mainly the respiratory system along with the urogenital system. In this context, we recommend elimination of the risk factors related to hygiene, temperature, chemical-toxic exposures (formaldehyde fumigation, etc.), unbalanced nutrition, inadequate ventilation, and prevention of IBV infection and opportunistic agents like *B. avium* with prophylactic vaccination.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was obtained from PhD Dissertation entitled as "Examination of Pathomorphological Findings in Experimental Infectious Bronchitis Virus M41 Strain and *Bordetella avium* in Chicks" (Graduate School of Health Sciences of Ankara University, 2010).

This research was financially supported by the Afyon Kocatepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project no:07VF05) Ankara University Faculty of Veterinary Medicine Ethics Committee decided that this study is in accordance with the "Ethics Committee Directive"(decision number: 23, 23 May 2006).

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Ambali AG, Jones RC.** Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 1990; 34: 809-817.
- Arp LH, Cheville NF.** Tracheal lesions in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res.* 1984; 45: 2196-2200.
- Benyeda Z, Szeredi L, Mató T, Süveges T, Balka G, Abonyi-Tóth Z, Rusvai M, Palya V.** Comparative histopathology and immunohistochemistry of QX-like, Massachusetts and 793/B serotypes of infectious bronchitis virus infection in chickens. *J Comp Pathol.* 2010 Nov;143(4):276-83.
- Bilgehyan H.** Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. baskı. İzmir Şafak Matbaacılık.2004. Bölüm 7: 131-144.
- Blackall PJ, Doheny CM.** Isolation and characterisation of *Bordetella avium* and related species and an evaluation of their role in respiratory disease in poultry. *Aust Vet J.* 1987; 64: 235-238.
- ButcherGD, Winterfield RW, Shapiro DP.** Pathogenesis of H13 nephropathogenic infectious bronchitis virus. *Avian Dis.* 1990; 34: 916-921.
- Bwala DG, Solomon P, Duncan N, Wandrag DBR, Abolnik C.** Assessment of *Mycoplasma gallisepticum* vaccine efficacy in a co-infection challenge model with QX-like infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 2018;47(3):261-270.
- Cavanagh D.** Severe acute respiratory syndrome vaccine development experiences of vaccination against avian infectious bronchitis coronavirus. *Avian Pathol.* 2003; 32: 567-582.
- Cavanagh D, Naqi SA.** Infectious Bronchitis. In: *Poultry Disease.* 2003; Chapter 3. 11th ed. Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, Mcdougald LR, Swayne DE, eds. Iowa: Iowa State University Press, 2003.
- Cavanagh, D. & Gelb, J.,** 2008, "Infectious bronchitis" in Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. Mcdougald, L.K. Nolan & D.E. Swayne (eds.), *Diseases of poultry*, p. 117–135, Wiley-Blackwell, Ames.
- Chen BY, Itakura C.** Histopathology and immunohistochemistry of renal lesions due to avian infectious bronchitis virus in chicks uninoculated and previously inoculated with highly virulent infectious bursal disease virus. *Avian Pathol.* 1997; 26: 607-624.
- Chong KI, Apostolov K.** The pathogenesis of nephritis in chickens induced by infectious bronchitis virus. *J Comp Pathol.* 1982; 92: 199-211.
- Chousalkar KK, Roberts JR, Reece R.** Histopathology of two serotypes of infectious bronchitis virus in laying hens vaccinated in the rearing phase. *Poultry Sci.* 2007; 86: 59-62.
- Raj GD, Jones RC.** Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.* 1997; 26: 677-706.
- Ducatelle R, Meulemans G, Coussement W, Hoorens J.** Aetio-pathology of the fowl trachea early after inoculation with H52 infectious bronchitis virus. *J Vet Med B.* 1984; 31:151-160.
- Dwars RM, Matthijs MGR, Daemen AJJM, Van Eck JHH, Vervelde L, Landman WJM.** Progression of lesions in the respiratory tract of broilers after single infection with *Escherichia coli* compared to superinfection with *E. coli* after infection with infectious bronchitis virus. *Vet Immunol Immunop.* 2009; 127: 65-76.
- El-Sukhon SN, Musa A, Al-Attar M.** Studies on the bacterial etiology of air sacculitis of broilers in northern and middle Jordan with special reference to *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, and *Bordetella avium*. *Avian Dis.* 2002; 46: 605-612.
- Fabricant J, Levine PP.** Experimental production of complicated chronic respiratory diseaseinfection ('air sac' disease). *Avian Dis.* 1962; 6: 13-23.
- Fernando F, Montassier MFS, Silva KR, MFS, Okino CH, de Oliveira, ES, Fernandes CC, Bandarra, MB, Goncalves, Borzi MM, Santos RM, Vasconcelos R, Alessi AC, Montassier H.** Nephritis Associated with a S1 Variant Brazilian Isolate of Infectious Bronchitis Virus and Vaccine Protection Test in Experimentally Infected Chickens. *Int J Poult Sci.* 2013;12;639-646.
- Fırat İ.** İnfeksiyöz bronşitis virusunun üç patojen susu ile enfekte edilen civcivlerdeki nefrolojik bulguların histopatolojik karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. 1995.
- Garside JS.** The histopathological diagnosis of avian respiratory infections. *Vet Rec.* 1965; 27:354-356.
- Goryo M, Umemura T, Itakura C.** Concurrence of nephrosis-nephritis due to infectious bronchitis virus and infectious bursal disease in broiler chickens. *Avian Pathol.* 1984; 13: 191-200.
- Gross WB.** Symposium on chronic respiratory diseases of poultry. II. The role of *Escherichia coli* in the cause of chronic respiratory disease and certain other respiratory diseases. *Am J Vet Res.* 1958; 19: 448-452.
- Gross WB.** The development of "air sac disease." *Avian Dis.* 1961; 5:431-439.
- Jackwood MW, Mc Carter SM, Brown TP.** *Bordetella avium*: An opportunistic pathogen in Leghorn chickens. *Avian Dis.* 1995; 39: 360-367.
- Jackwood MW, Saif YM.** Bordetellosis. In: *Poultry Disease,* chapter 21. 11th ed. Saif YM, Barnes HJ, Fadly AM, Glisson JR, Mcdougald LR, Swayne DE, eds. Iowa: Iowa State University Press, 2003.
- Jackwood, M. W., and S. de Wit.** Infectious bronchitis. In: *Diseases of poultry,* 13th ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. Nair, eds. John Wiley and Sons, Inc., Ames, IA. pp. 139–159. 2013.
- Janse EM, Van Roozelaar D, Koch G.** Leukocyte subpopulations in kidney and trachea of chickens infected with infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 1994; 23: 513-523.
- Kinde H, Daft B, Castro AE, Bickford AA, Gelb J, Reynolds B.** Viral pathogenesis of a nephrotropic infectious bronchitis virus isolated from commercial pullets. *Avian Dis.* 1991; 35: 415-421.
- King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. &Lefkowitz, E.J. (eds.),** 2012, *Virus taxonomy – Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses,* Elsevier, London.
- Lister SA, Alexander DJ.** Turkey rhinotracheitis: A review. *Vet Bull.* 1986; 56: 633-663.
- Liu P, Deng G, Guo XQ, et al.,** 2015. Clinicopathology of gout in growing layers induced by avian nephrotrophic strains of infectious bronchitis virus. *Pak Vet J.* 2015; 35:345-9.

- Luna LG. Routine Staining Procedures.** Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York: McGraw-Hill. 1968, 32-47.
- Matthijs MGR, Van Eck JHH, Landman WJM, Stegeman JA.** Ability of Massachusetts-type infectious bronchitis virus to increase colibacillosis susceptibility in commercial broilers: A comparison between vaccine and virulent field virus. *Avian Pathol.* 2003; 32: 473-481.
- McMartin DA.** Infectious Bronchitis. In: *Virus Infections of Vertebrates. Virus Infections of Birds.* Vol 4. McFerran JB, Mccnulty MS, eds. Amsterdam: Elsevier Science, 1993. 249-275.
- Montgomery RD, Kleven SH, Villegas P.** Observations on the pathogenicity of *Alcaligenes faecalis* in chickens. *Avian Dis.* 1983; 27: 751-761.
- Nakamura K, Cook JKA, Otsuki K, Huggins MB, Frazier JA.** Comparative study of respiratory lesions in two chicken lines of different susceptibility infected with infectious bronchitis virus: Histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Avian Pathol.* 1991; 20: 241-257.
- Nakamura K, Imai K, Tanimura N.** Comparison of the effects of infectious bronchitis and infectious laryngotracheitis on the chicken respiratory tract. *J Comp Pathol.* 1996; 114: 11-21.
- Odugbo MO, Musa U, Ekundayo SO, Okewole PA, Esilonu J.** *Bordetella avium* infection in chickens and quail in Nigeria: Preliminary investigations. *Vet Res Commun.* 2006; 30: 1-5.
- Owen RL, Cowen BS, Hattel AL, Naqi SA, Wilson RA.** Detection of viral antigen following exposure of one-day-old chickens to the Holland 52 strain of infectious bronchitis virus. *Avian Pathol.* 1991; 20: 663-673.
- Pohl R.** The histopathogenesis of the nephrosis-nephritis syndrome. *Avian Pathol.* 1974; 1: 1-13.
- Purcell DA, McFerran JB.** The histopathology of infectious bronchitis in the domestic fowl. *Res Vet Sci.* 1972; 13: 116-122.
- Purcell DA, Tham VL, Surman PG.** The histopathology of infectious bronchitis in fowls infected with a nephrotropic "T" strain of virus. *Aust Vet J.* 1976; 52: 85-91.
- Reed L, Muench H.** A simple method of estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.* 1939;27: 493-497.
- Saif YM, Moorhead PD, Dearth RN, Jackwood DJ.** Observations on *Alcaligenes faecalis* infection in turkeys. *Avian Dis.* 1980; 24: 665-684.
- Sainte-Marie G.** A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *J Histochem Cytochem.* 1962; 10: 250-256.
- Schulz LC.** Krankheiten und Syndrome. In: *Pathologie der Haustiere Teil II.* Germany. 1991,222-224.
- Simmons DG, Gray JG, Rose LP.** Isolation of an etiologic agent of acute respiratory disease (Rhinotracheitis) of turkey poults. *Avian Dis.* 1978; 23: 195-203.
- Smith HW, Cook JKA, Parsell ZE.** The experimental infection of chickens with mixture of infectious bronchitis virus and *Escherichia coli*. *J Gen Virol.* 1985; 66: 777-786.
- Van Alstine WG, Hofstad MS.** Antibiotic aerolization: The effect on experimentally induced *alcaligenes* rhinotracheitis in turkeys. *Avian Dis.* 1985; 29: 159-176.
- Van Alstine WG, Arp LH.** Effects of *Bordetella avium* infection on the pulmonary clearance *E. coli* in turkeys. *Am J Vet Res.* 1987; 48: 922-926.
- Van Alstine WG, Arp LH.** Histologic evaluation of lung and bronchus-associated lymphoid tissue in young turkeys infected with *Bordetella avium*. *Am J Vet Res.* 1988; 49: 835-839.
- Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G. and Monne, I.** S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol.* 2016; 39: 349-364.

Effects of Surgical Skills of Veterinary Medicine Students on Postoperative Stress, Oxidative Stress and Pain in Bitches Undergoing Ovariohysterectomy

Merve CAN¹, Oktay YILMAZ^{1*}

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

This study was designed to demonstrate the effects of surgical skills of final-year veterinary medicine students relating to total surgery time and skin incision length on postoperative stress, oxidative stress and pain in bitches undergoing ovariohysterectomy under identical anaesthesia and surgical procedures. The control group (n=12) consisted of bitches that were operated on by an experienced surgeon, while the ovariohysterectomies in the experiment group (n=12) were performed by final-year veterinary medicine students. Blood samples were taken 24 hours before the surgery, during premedication, at the end of surgery and 30 minutes, 1, 2, 4 and 6 hours after surgery for the analysis of cortisol, total oxidant status (TOS), total antioxidant status (TAS) and for the calculation of the oxidative stress index (OSI). Modified Melbourne Pain Scale was used for pain assessment. It was observed that the total surgery time and length of skin incision in the experiment group were significantly higher ($p<0.001$) than those detected in the control group. The concentrations of cortisol were statistically higher ($p<0.001$) in the experiment group than those measured in the control group, apart from the concentrations measured at 24 hours before surgery. The concentrations of TOS and TAS did not show any significant differences within and between groups. Similarly, OSI did not differ within groups. However, OSI values at premedication time in the experiment group were statistically higher ($p<0.05$) than those calculated in the control group. Pain scores did not differ within and between groups. In conclusion, it is indicated that the blood cortisol concentrations tend to increase due to the surgery time or the length of skin incision. Moreover, ovariohysterectomies may be safely performed by final-year veterinary medicine students without any postoperative pain.

Keywords: Cortisol, dog, pain, TOS, TAS.

Veteriner Hekimliği Öğrencilerinin Cerrahi Becerilerinin Ovaryohistektomi Yapılan Köpeklerde Postoperatif Stres, Oksidatif Stres ve Ağrı Üzerine Etkileri

ÖZ

Sunulan çalışmada, veteriner hekimliği eğitiminin son sınıfında olan öğrencilerin, toplam operasyon süresi ve deri ensizyonu uzunluğu ile ilişkili olan cerrahi becerilerinin operasyon sonrası stres, oksidatif stres ve ağrı üzerine etkilerinin aynı anestezi ve cerrahi prosedürler altında ortaya konulması amaçlandı. Tecrübeli bir hekimin opere ettiği köpekler kontrol grubunu (n=12) oluştururken, veteriner fakültesi son sınıfta eğitim gören öğrenciler tarafından opere edilen köpekler (n=12) deneme grubunu oluşturdu. Operasyondan 24 saat önce, premedikasyon sırasında, operasyon sonunda ve operasyondan 30 dakika, 1, 2, 4 ve 6 saat sonra kan örnekleri toplanarak kortizol, toplam oksidant durum (TOD), toplam antioksidant durum (TAD) ölçüldü ve oksidatif stres indeksi (OSI) hesaplandı. Modifiye edilmiş Melbourne Ağrı Skalası ağrı değerlendirilmesi için kullanıldı. Deneme grubundaki köpeklerde, toplam operasyon süresi ve deri ensizyon uzunluğunun kontrol grubundaki köpeklerden istatistiksel olarak ($p<0.001$) daha yüksek olduğu gözlemlendi. Deneme grubunda ölçülen kortizol düzeylerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek ($p<0.001$) olduğu, ancak operasyondan 24 saat önceki değerlerde farklılık olmadığı belirlendi. TOD ve TAD düzeylerinin gruplar içinde ve arasında önemli farklılık oluşturmadığı izlendi. Benzer şekilde, OSI değerleri de gruplar içinde farklılık oluşturmadı. Bununla birlikte, deneme grubunda premedikasyon sırasındaki OSI değerlerinin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek ($p<0.05$) olduğu gözlemlendi. Ağrı skorları ise gruplar içinde ve arasında farklılık oluşturmadı. Sonuç olarak, operasyon süresi ve deri ensizyonu uzunluğu ile ilişkili olarak kortizol düzeylerinin artış eğiliminde olduğu belirlendi. Diğer taraftan, veteriner hekimliği son sınıf öğrencilerinin de operasyon sonrası ağrıya neden olmadan güvenli bir şekilde kısırlaştırma operasyonları gerçekleştirebileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Kortizol, köpek, ağrı, TOD, TAD.

To cite this article: Can M. Yılmaz O. Effects of Surgical Skills of Veterinary Medicine Students on Postoperative Stress, Oxidative Stress and Pain in Bitches Undergoing Ovariohysterectomy. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):149-158

Submission: 21.12.2020 Accepted: 26.02.2021 Published Online: 28.02.2021

ORCID ID; MC: 0000-0002-1394-8429 OY: 0000-0002-9722-5155 *Corresponding author e-mail: oktayyilmaz@aku.edu.tr

INTRODUCTION

Upon their first employment, newly graduated veterinary surgeons are required to be competent in performing ovariohysterectomy procedures (OVH) (Hill et al., 2012), since OVH is one of the most common surgical practices in veterinary medicine. The European Coordination Committee for Veterinary Training (ECCVT) declares the directive 'Day One Competence' which describes the minimum standard required and is the starting point for a variety of roles in the veterinary profession (ECCVT, 2015). The surgical procedure of ovariohysterectomy does not only induce the oxidative stress and inflammatory process which might lead to short or long term side effects (Kucukakin et al., 200) but also causes the postoperative pain (Devitt et al 2005). The main problems facing newly-graduated veterinary surgeons are a lack of confidence and competence in basic skills, thus leading to the possibility of stressful initiations to their professional careers (Bowl et al., 2011). The OVH is an excellent teaching procedure for veterinary students (Zeugschmidt et al., 2016) due to its surgical complexity that requires basic knowledge about abdominal cavity anatomy, anaesthesia, antisepsis procedures, surgical instruments, suturing and surgical handling (Fossum., 2007). However, many veterinary medicine students (Langebaek et al., 2012) find the OVH surgical procedure to be challenging and stressful due to lack of self-confidence and experience. OVH is also very commonly the first live surgery experience for students of veterinary medicine and research has indicated that many students undertaking training in OVH report negative emotions such as nervousness, apprehension and stress (Langebaek et al., 2012). Surgical stressors and their impacts can influence the judgment, decision making and communication skills of junior surgeons who may show uncertainty about their ability to cope (Wetzel et al., 2006) leading to increased surgery durations and complication rates (Blacklock et al., 2016). Positive correlations between longer durations of surgery and anaesthesia and the incidence of wound infection, as well as teaching costs, have been demonstrated (Brown et al., 1997). Indeed, the biggest two concerns for final year students performing desexing surgeries are to finish the surgery in a reasonable amount of time (Gates et al., 2018) and to manage any postoperative bleeding (Blacklock et al., 2016; Gates et al., 2018). In contrast, the management of postoperative pain is of much less concern in performing these surgeries (Gates et al., 2018). In addition, evaluations of the attitudes of graduating veterinary students show that the clear definition of the recognition and the treatment of pain in animals is not sufficient (Hellyer et al., 1999). It has been reported that surgery time is inversely related to veterinary student experience, in that the time decreases, as their level of experience increases (Freeman et al., 2017). Since OVH has been an excellent teaching model for surgical procedures as

mentioned, this raises the question whether or not surgical manipulations in OVH procedures performed by veterinary medicine students may cause undue postoperative stress, oxidative stress and pain. Therefore, this study was designed to demonstrate how the surgical skills of final year veterinary medical students relating to total surgery time and skin incision length correspond to postoperative stress, oxidative stress and pain in bitches undergoing OVH.

MATERIALS and METHODS

A total of 24 bitches of different breeds which had been referred to the Afyon Kocatepe University animal hospital for elective OVH, were used in the study. The animals were aged 1 – 3 years and weighed 25 ± 2.1 kg on average. All procedures were approved by the local ethics committee of Afyon Kocatepe University (AKUHADYEK-156-16). The bitches were hospitalised for surveillance one day before the elective OVH at the animal hospital and were fasted for 8 hours with water consumption. First blood sampling and handling 24 hours prior to surgery were performed by the experienced veterinary surgeon.

The dogs were randomly divided into two equal groups. All surgical procedures, except anaesthesia and blood sampling but including fixing the patient to the surgery table, transferring the patient to the hospitalisation unit and OVH surgery in the experiment group ($n = 12$) were performed by veterinary students who were class participants in the last term of final-year. One student took the lead role as surgeon, whereas the other student was the assisting surgeon. All students had received training in procedures including handling protocols, surgical preparations and surgical protocols for OVH in their fourth and fifth-year classes. All students had performed both assisting and leading roles in OVH surgery on bitches before this study. Surgeries in the control group ($n = 12$) were performed by one experienced surgeon (MA) with one assisting student. This same experienced surgeon performed all anaesthesia and blood sampling in both groups. Moreover, all surgeries were instructed by a lecturer surgeon (OY).

Anaesthesia and Surgery

A standard anaesthesia protocol was used for the dogs in both the control and experiment groups as previously described elsewhere (Korkmaz et al., 2019). Accordingly, atropine sulphate (subcutaneous, 0.045 mg/kg, Atropin, Deva Holding, Istanbul, Turkey) was administered approximately 30 minutes before general anaesthesia. Midazolam (intravenous, 0.3 mg/kg, Dormicum, Roche, Istanbul, Turkey) was injected for preanaesthetic medication. Meloxicam (subcutaneous, 0.2 mg/kg, Maxicam, Sanovel, Turkey) was injected following premedication. After sedation, anaesthesia was induced with propofol (intravenous, Propofol, 4 mg/kg, Fresenius Kabi, Istanbul, Turkey). The dogs

were orotracheally intubated using cuffed endotracheal tubes and connected to the automatic anaesthesia machine (SMS 2000, SMS Medical, Ankara, Turkey). General anaesthesia was maintained by administration of 2 % isoflurane (Forane, Abbott Laboratories, Istanbul, Turkey). Intravenous lactated Ringer's solution (10 ml/kg/h) was provided throughout the procedure. All dogs were monitored (Petas KMA 800, Profesyonel Elektronik Sanayi ve Ticaret, Ankara, Turkey) for their heartbeat and respiratory rates.

The ventral abdomen was prepared aseptically for surgery following the general anaesthesia. Briefly, a ventral midline skin incision was performed at the middle third of the umbilicopubic distance. After reaching the abdominal cavity, the uterine ligament was attached to a uterine hook to hold the uterus. Each ligamentum suspensorium ovarii was dissected by hand. The ovarian pedicles were ligated and then the ovaries were removed. The uterine body was separated from the broad ligament. Additional ligation was performed on the broad ligament, if bleeding was evident. After the ligation of the proximal part of the cervix uteri, the abdominal wall and the skin were closed. All data were recorded by the same researcher during each surgical procedure. The time between the start of skin incision and placement of the last skin suture was defined as total surgery time. The length of the ventral midline skin incision was measured by a caliper at the end of each surgery.

The students were observed by the same person who recorded the starting and finishing times of surgery. The data recorded was not shared with students so as to reduce the potential impacts of competitive stress on their performance. Moreover, students were set free for decision making and advice was not provided unless they specifically requested an opinion from the observer. The length of skin incision data were also not shared with students during the surgeries. Each dog received daily injections of penicillin + streptomycin (intramuscular, 20 mg/kg, IM Penoksal, Vilsan, Istanbul, Turkey) for five days. The sutures were removed 10 days after surgery.

Blood Sampling

Blood samples were collected to measure serum cortisol concentrations, total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) 24 hours prior to surgery (T-24), during premedication (T), at the end of surgery (T0), 30 minutes after surgery (T^{1/2}) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after the end of surgery. Blood samples were immediately centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes and then sera were stored at -20°C until further analysis of cortisol (ng/mL), TOS (μmol H₂O₂ Eq/L) and TAS (mmol Trolox Eq/L) (Erel, 2004; Erel 2005) by commercial kits using ELISA method (Table 1). Oxidative stress index (OSI) was determined by the ratio of the values of TOS to TAS (Lee and Kim, 2014). The results were reported as arbitrary units (AU).

Table 1: The sensitivity, coefficient of variations (intra- and interassay) and commercial provider of test kits for cortisol, total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS).

Test	Sensitivity	Coefficient of variations		Provider
		Intraassay	Interassay	
Cortisol	2.50 ng/mL	8.1%	6.6%	EIA – 1887, DRG, USA
TOS	1.20 mmol/L	3.9%	3.2%	Mega Tip, Gaziantep, Turkey
TAS	4.00 μmol/L	3.3%	2.8%	Mega Tip, Gaziantep, Turkey

Evaluation of Pain Scores

Modified Melbourne Pain Scale (MMPS) (Odette and Lesley, 2013) was used for the evaluation of pain by the same person, who did not know the groups in the study. This blind assessment was performed at the end of surgery (T0), 30 minutes after surgery (T^{1/2}) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after the end of surgery. Butorphanol (intravenous, 0.2 mg/kg, Butomidol, Richter Pharma, Austria) was used as a rescue analgesic, when the MMPS was scored higher than 9 points.

Statistics

The distribution of normality of data were analysed by Shapiro-Wilk normality test. All data had the normal distribution. Therefore, differences in total surgery time, length of skin incision, concentrations of cortisol, TOS and TAS, OSI rates and pain scores between groups were compared using the analysis of variance followed by t test. A repeated measures two-way ANOVA test was used to compare differences within the groups (SPSS 16.0). Data of total surgery time, length of skin incision and pain scores were described by mean ± Standard Deviation (SD), whereas cortisol, TOS, TAS and OSI were shown by mean ± Standard Error Mean (SEM). The data were considered to be significantly different at p < 0.05.

RESULTS

Final year veterinary students in the control group did not request any hands-on support during surgeries. Moreover, no complications occurred and no rescue analgesics were needed in the control and experiment groups throughout the study. It was observed that the total surgery time was 22.50 ± 4.50 minutes in the control group, as opposed to 58.50 ± 6.28 minutes in the experiment group ($p < 0.001$). The length of skin incision in the control group (1.88 ± 0.17 cm) was shorter ($p < 0.001$) than that detected in the experiment group (10.75 ± 1.40 cm).

The mean concentrations of cortisol in the control and experiment groups are given in Table 2. Accordingly, it was seen that the concentrations of cortisol at T-24 in the control group were lower than those at premedication time (T) but there was no statistical difference. On the other hand, the concentrations of cortisol were seen to be increased ($p < 0.001$) at the end of surgery (T0) and higher ($p < 0.001$) concentrations of cortisol were evident at T^{1/2}, T1 and T2 as compared to T-24 and T. It was observed that the concentrations of cortisol fell to baseline at T4 and T6 ($p < 0.001$). In the experiment group, a different cortisol concentration pattern was detected. The concentrations of cortisol at T showed nonsignificant increments as compared to T-24. However, it was

detected that the cortisol concentrations measured at the end of surgery (T0) and throughout T^{1/2}, T1, T2 and T4 were higher than those measured at T-24 and T ($p < 0.001$). The concentrations of cortisol at T6 were similar to the concentrations observed at T, T2 and T4, whereas the levels at T6 differed from those at other measurement times ($p < 0.001$). The comparison of cortisol concentrations between the control and experiment groups showed that there was no significant difference at T-24. Nevertheless, the cortisol concentrations at other measurement times in the experiment group were higher than those detected in the control group ($p < 0.001$) (Figure 1).

The mean concentrations of TOS, TAS and the OSI values in the control and experiment groups are given in Table 3. The concentrations of TOS and TAS in the control and experiment groups did not show any significant difference within and between groups (Figure 1). Similarly, OSI did not differ in the control and experiment groups. However, it was seen that OSI values at premedication time in the experiment group were higher than those calculated in the control group ($p < 0.05$).

Finally, pain assessment demonstrated that pain scores in both the control and experiment groups did not differ at any of the scoring times. Moreover, there was no significant difference between the control and experiment groups (Table 4).

Table 2: Blood cortisol concentrations (ng/mL) measured at 24-hour prior to surgery (T24), during premedication (T), at the end of surgery (T0), 30 minutes after the end of surgery (T^{1/2}) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after surgery in the control and experiment groups (Mean \pm SEM).

Blood sampling time (hour)	Control group (n = 12)	Experiment group (n = 12)
T-24	55.05 \pm 10.52 ^b	56.91 \pm 7.34 ^d
T	36.87 \pm 3.92 ^b	105.42 \pm 16.90 ^{cd}
T0	98.41 \pm 6.84 ^a	316.92 \pm 13.31 ^a
T ^{1/2}	106.68 \pm 7.85 ^a	300.58 \pm 12.67 ^a
T1	126.66 \pm 10.87 ^a	284.42 \pm 20.82 ^a
T2	100.62 \pm 10.10 ^a	257.60 \pm 29.66 ^{ab}
T4	59.89 \pm 7.95 ^b	168.48 \pm 24.92 ^{ab}
T6	46.81 \pm 5.57 ^b	138.07 \pm 7.98 ^{bc}

Superscript letters ^(abcd) indicate significant difference within groups ($p < 0.001$).

Table 3: Blood total oxidant status (TOS, $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L), total antioxidant status (TAS, mmol Trolox Eq/L) and the oxidative stress index (OSI, arbitrary unit) [TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L)/TAS (mmol Trolox Eq/L)] detected at 24-

hour prior to surgery (T24), during premedication (T), at the end of surgery (T0), 30 minutes after surgery (T½) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after the end of surgery in the control (C; n = 12) and experiment (E; n = 12) groups (Mean ± SEM).

Test	Groups	T-24	T	T0	T½	T1	T2	T4	T6
TOS	C	3.35±0.10	4.02±0.24	3.38±0.16	3.85±0.27	3.68±0.32	3.89±0.33	4.13±0.48	3.89±0.29
	E	3.22±0.22	4.08±0.36	3.56±0.28	3.20±0.10	3.84±0.24	3.76±0.37	3.95±0.32	3.85±0.37
TAS	C	1.81±0.10	1.74±0.10	1.70±0.15	1.70±0.19	1.59±0.24	1.78±0.21	1.79±0.03	1.79±0.04
	E	1.80±0.01	1.66±0.16	1.71±0.21	1.57±0.26	1.64±0.32	1.78±0.26	1.65±0.23	1.80±0.01
OSI	C	1.85±0.06	1.79±0.12*	2.30±0.14	2.48±0.24	2.01±0.18	2.08±0.11	2.26±0.13	2.09±0.18
	E	2.37±0.27	2.41±0.22	2.18±0.22	2.11±0.20	2.30±0.26	2.48±0.34	2.16±0.16	2.12±0.20

* Indicates significant difference between groups (p < 0.05).

Table 4. Distribution of pain scores (Mean ± SEM) detected at 24-hour prior to surgery (T24), during premedication (T), at the end of surgery (T0), 30 minutes after surgery (T½) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after end of surgery in the control and experiment groups (Mean ± SD).

Pain assessment time	Control group	Experiment group
(hour)	(n = 12)	(n = 12)
T0	3.00 ± 0.89	3.66 ± 0.81
T½	2.66 ± 0.51	2.83 ± 1.60
T1	2.56 ± 1.53	3.10 ± 0.51
T2	3.00 ± 0.63	2.66 ± 0.51
T4	2.83 ± 0.40	2.16 ± 0.75
T6	3.33 ± 1.63	2.50 ± 0.54

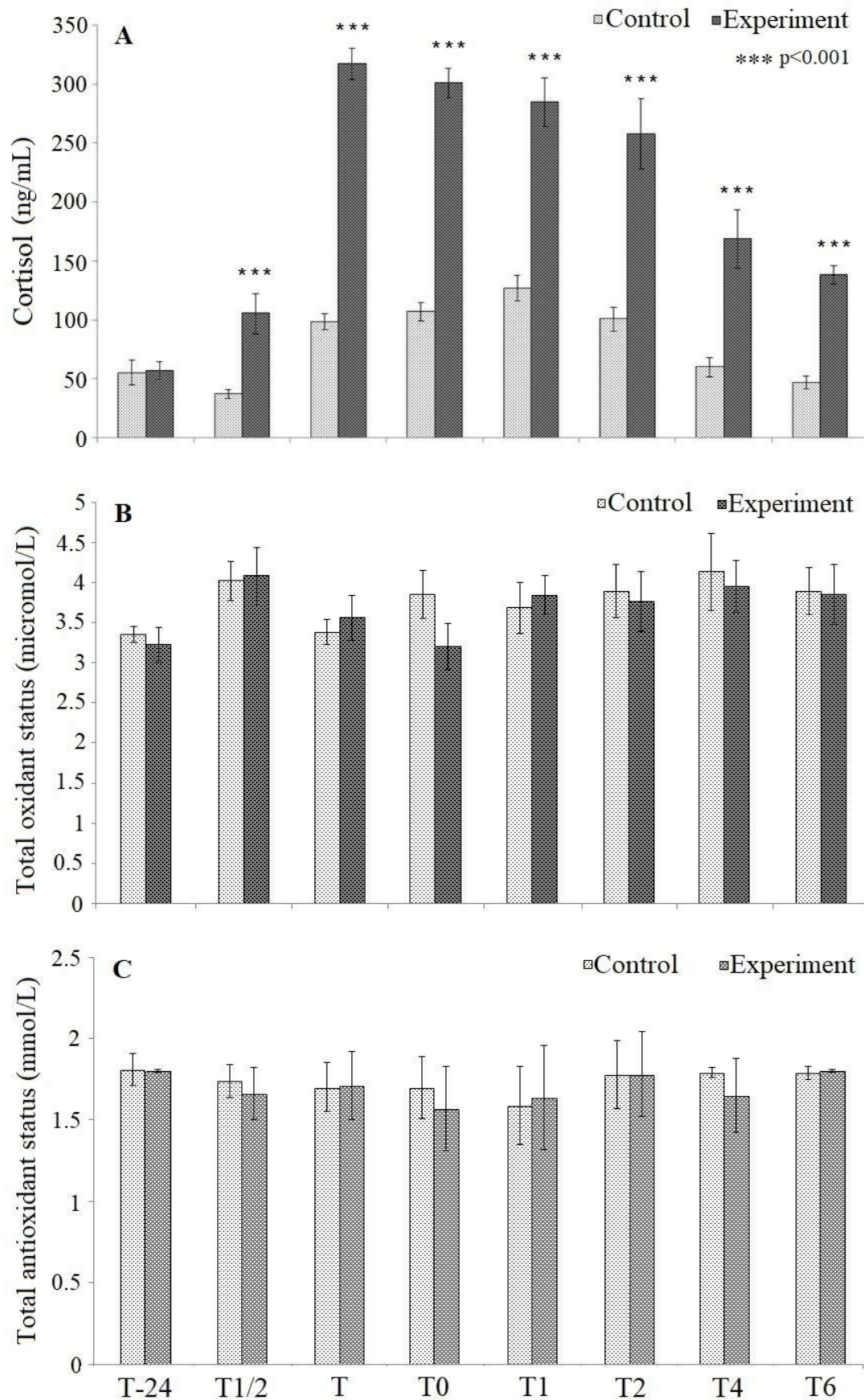


Figure 1. The comparison of blood cortisol (ng/mL) (A), total oxidant status ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Eq/L) (B), total antioxidant status (mmol Trolox Eq/L) (C) at 24-hour prior to surgery (T24), during premedication (T), at the end of surgery (T0), 30 minutes after surgery (T $\frac{1}{2}$) and 1 (T1), 2 (T2), 4 (T4) and 6 (T6) hours after the end of surgery between the control and experiment groups.

DISCUSSION

Ovariohysterectomy, a common surgical procedure in dogs, is an elective surgery which causes tissue trauma, inflammation and pain due to intraabdominal surgical manipulations (Lemke et al., 2002). An elective surgery is performed on healthy animals which do not have any pre-existing pain. It is in evidence that OVH is a common model for evaluating postoperative stress and pain (Benson et al., 2000; Devitt et al., 2005; Michelsen et al., 2012; Tsai et al., 2013, Yilmaz et al., 2014, Korkmaz et al., 2019, Çolak and Yilmaz, 2020). In addition to this, small animal OVH as a live-animal surgery is the most common surgical procedure in veterinary teaching hospitals because the procedure contains basic knowledge about both anaesthesia and surgery. Therefore, the OVH model was evaluated in this study.

It is known that the total surgery time of OVH performed by experienced veterinary surgeons is 17 minutes on average with 1.5 – 2.5 cm width skin incision (Michelsen et al., 2012; Korkmaz et al., 2019). In contrast when students perform OVH, the duration of surgery time varies between 60 and 135 minutes, associated with the level of the students (Zeugschmidt et al., 2016) and the nature and type of teaching procedures such as how surgery is supervised (Bowlit et al., 2011; Harris et al., 2013; Freeman et al., 2014; Gates et al., 2018) and whether training includes tools such as virtual reality (Hunt et al., 2020), video recordings and plastic spay simulator models (Read et al., 2016; Shaver et al., 2019; Annandale et al., 2020). Similarly, the length of skin incision varies between 4 – 9 cm (Freeman et al., 2014) and 9.6 ± 3.4 cm (Harris et al., 2013). In the present study, it was observed that total surgery time (58.50 ± 6.28 minutes) and length of skin incision (10.75 ± 1.40 cm) in the experiment group was consistent with the above mentioned studies. The surgeries in the control group were performed in 22.50 ± 4.50 minutes with 1.88 ± 0.17 cm skin incision. It is suggested that the experience of the surgeon is inversely proportional to the total surgery time and the length of skin incision.

The concentrations of catecholamines, adrenocorticotrophic hormone (ACTH), cortisol and insulin increase in the body in response to surgical manipulations. The enhancement of these hormones continues to increase during surgery and reaches their peak concentrations at the end of surgery. The stress related to OVH is short term and it returns to preoperative values five hours after surgery (Benson et al., 2000) but the concentration of cortisol reaches its basal values 12 hours (Yilmaz et al., 2014; Korkmaz et al., 2019) or 24 hours after surgery (Church et al., 1994; Fox et al., 1994; Benson et al., 2000). It appears that the measurement of cortisol is a good indicator to evaluate stress response in dogs. Therefore, the concentrations of cortisol were evaluated in this study.

It was observed that the concentrations of cortisol, which started to increase at the end of surgery (T0) in the control group, returned to the premedication concentrations four hours after the end of surgery. The increasing concentrations of cortisol in the experiment group returned to premedication concentrations six hours after the end of surgery. It was indicated that this pattern observed in both groups was in accordance with other reports (Church et al., 1994; Fox et al., 1994; Benson et al., 2000; Kim et al., 2012; Yilmaz et al., 2014; Korkmaz et al., 2019). It is suggested that the reason for the late response of cortisol in the experiment group might be increased surgical trauma due to the longer total surgery time and length of skin incision. On the other hand, it was seen that the concentrations of cortisol measured at 24 hours prior to surgery did not differ significantly between the control and experiment groups, whereas the cortisol levels detected at other measurement times in the experiment group were higher than those observed in the control group. This observation supports that surgery time, the length of skin incision and the relevant experience of the surgeon may be the main factors affecting the concentrations of cortisol in blood after ovariohysterectomy.

Although one of the goals of this study was the investigation of the effect of surgery on pain response, the injection of any pain killer such as meloxicam was mandatory in both the control and the experiment groups due to ethical concerns. In doing so, it might be expected that the concentrations of cortisol were decreased by the injection of meloxicam via the inhibition of prostaglandins due to the inhibition of cyclooxygenase (COX) enzyme (Yilmaz et al., 2014). Meloxicam is a selective COX2 inhibitor and it inhibits the release of prostaglandins in the middle or long term (Distel et al., 1996). Moreover, it has been reported that the concentrations of cortisol remain high after OVH in dogs following the injection of meloxicam (Yilmaz et al., 2014). Therefore, it is suggested that the injection of COX1 selective anti-inflammatory drugs for acute response (Dow et al., 1990) may be an alternative to COX2 inhibitors such as meloxicam.

Oxidative stress in the body defines the production of reactive oxygen species (ROS) and the balance between ROS and the antioxidant defense mechanism to detoxify the ROS (Sies, 1997). The dense oxidative stress during surgery resulting in severe cellular damage may cause poor postoperative outcomes (Sies, 1997) thus, the minimisation of oxidative stress becomes crucial (Lee and Kim, 2014). On the other hand, the multiple actions of various antioxidants in the blood protect the organs against the harmful effects of ROS (Erel, 2004). The measurement of the concentrations of TOS and TAS in blood indirectly reflects the overall oxidative stress and antioxidant activity, respectively (Erel, 2004). Any unfavourable alteration in normal body homeostasis due to surgery is called surgical stress (Anup and Balasubramanian, 2000; Anup et al.,

1999). Therefore, if the surgery itself is involved in the surgical stress, an alteration of the concentrations of TOS would be expected after induction of anaesthesia and surgery (Koksal and Kurban, 2010; Lee and Kim, 2014). Nevertheless, in this study, the TOS concentrations within and between groups did not differ significantly which was an unexpected result. It has been reported that the changes in TOS are significantly higher in open surgery as compared to laparoscopic surgery in dogs (Lee and Kim, 2014). Therefore, it is suggested that open surgery itself, regardless of the length of surgery time, may induce oxidative stress, since open surgery has been performed in both groups in this study. Further studies with numerous samples are needed to clarify this interaction. Similarly, nonsignificant changes in TAS concentrations within and between groups were observed in the present study. Indeed, it has been reported that TAS levels are the same in humans undergoing hysterectomies whether the peritoneum is sutured or not (Szymczyk et al., 2003), hence, the type of surgery, surgical techniques or operation times may not cause any significant changes in TAS concentrations (Lee and Kim, 2014). It is suggested that the antioxidant response of the body does not change under surgical circumstances. The present study also evaluated the ratio of TOS to TAS to indicate the degree of oxidative stress. It was observed that the highest OSI values in the control and experiment groups were at T $\frac{1}{2}$ and T $_2$, respectively, but these changes were not significant. It has been stated that surgery on abdominal walls and the manipulation of the intestines leads to oxidative stress in enterocytes and this alteration remains stable for 24 hours (Anup et al., 1999). The oxidant/antioxidant status is related to the surgery technique (laparoscopic or open surgery) and surgery time (Anup et al., 1999; Kozlik et al., 2015). Although OSI values calculated at premedication time in the experiment group were significantly higher than those detected in the control group, OSI in other measurement times did not differ between groups. All the above mentioned findings may suggest that open surgery, regardless of the relevant experience of the surgeon and the surgery time, causes oxidative stress, and the oxidative stress in ovariohysterectomies is not increased in surgical procedures performed by final year veterinary medicine students.

The attitudes of veterinary practitioners towards pain management reveals a lack of adequate awareness and knowledge of pain assessment, analgesics, and pain recognition and quantification in assessing the effectiveness of pain treatment (Raekallio et al., 2003; Hugonnard et al., 2004; Williams et al., 2005; Hewson et al., 2006). Several types of pain scoring systems have been developed to grade the severity of postoperative pain in animals. Pain scoring is based on the numerical rating of various indicators and behaviours and the total value is used for the assessment of severity of pain (Mathews et al., 2014). It seems that the modified

Melbourne Pain Scale is the more sensitive and specific pain assessment procedure in veterinary medicine (Firth and Haldane, 1999). It is known that the anaesthesia, surgery time, length of skin incision and the experience of the surgeon are the main factors affecting the postoperative pain scores (Carpenter et al., 2004; Devitt et al., 2005; Campagnol et al., 2012; Michelsen et al., 2012). Moreover, the possible surgery-related complications of performing OVH include intraabdominal haemorrhage, vaginal bleeding and ligation of the ureter in the short term (Van Goethem et al., 2006). Contrary to expectations in the present study, Modified Melbourne Pain Scoring showed that there was no significant difference within and between groups without the presence of any surgical complications. Although total surgery time was longer in the experiment group, it is suggested that the basic knowledge of final year veterinary medical students is sufficient to avoid undue trauma, when performing OVH and thereby causing no unnecessary severe pain. In conclusion, it is indicated that blood cortisol concentrations tend to increase in dogs undergoing OVH performed by final year veterinary medical students relating to the surgery time and the length of skin incision. It is nevertheless possible to conclude that OVH may be safely performed by veterinary medical students under the supervision of an experienced veterinary surgeon in dogs without any postoperative pain-related behavioural changes. Moreover, it is believed that supervision by employers of newly graduated veterinary surgeons might be beneficial in their employment to enhance their judgement and decision-making skills.

ACKNOWLEDGEMENT

This research article was summarized from the Master of Science thesis (Thesis No: 2019-010, Institute of Health Sciences, Afyon Kocatepe University). The data of the study were represented as poster presentation (in Turkish Veterinary Gynecology Association VIII National & II International Congress in Antalya, Turkey, held on 10-13 October 2019)

All procedures were approved by Local Ethic Committee of Afyon Kocatepe University (AKUHADYEK-156-16).

The authors thank to Prof. Dr. Aziz BULBUL (Mugla Sitki Kocman University) for the technical consultancy of the measurement of cortisol, TOS and TAS.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- Annandale A, Scheepers E, Fosgate GT.** The effect of an ovariohysterectomy model practice on surgical times for final-year veterinary students' first live-animal ovariohysterectomies. *J Vet Med Edu.* 2020; 47(1): 44-55.
- Anup R, Balasubramanian KA.** Surgical stress and the gastrointestinal tract. *J Surgical Res.* 2000; 92: 291-300.
- Anup R, Aparna V, Pulimood A, Balasubramanian KA.** Surgical stress and the small intestine: role of oxygen free radicals. *Surgery.* 1999; 125: 560-569.
- Benson GJ, Grubb TL, Neff-Davis C, Olson WA, Thurmon JC, Lindner DL, Tranquilli WJ, Vanio O.** Perioperative stress response in the dog: effect of pre-emptive administration of medetomidine. *Vet Surgery.* 2000; 29: 85-91.
- Blacklock KLB, Langer P, Halfacree Z, Yool DA, Corr S, Owen L, Friend ED, Ekiri A.** Canine Ovariohysterectomy: A Survey of Surgeon Concerns and Surgical Complications Encountered by Newly Graduated Veterinarians. *J Vet Med Edu.* 2016; 43(2): 184-189.
- Bowlit KL, Murray JK, Herbert GL, Delisser P, Ford-Fennah V, Murrell J, Friend EJ.** Evaluation of the expectations, learning and competencies of surgical skills by undergraduate veterinary students performing canine ovariohysterectomies. *J Small Anim Pract.* 2011; 52: 587-594.
- Brown DC, Conzemius MG, Schofer F, Swann H.** Epidemiological evaluation of postoperative wound infections in dogs and cats. *J Am Vet Med Assoc.* 1997; 210: 1302-1306.
- Campagnol D, Teixeira-Neto FJ, Monteiro ER, Restitutti F, Minto BW.** Effect of intraperitoneal or incisional bupivacaine on pain and the analgesic requirement after ovariohysterectomy in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2012; 39(4): 426-430.
- Carpenter RE, Wilson DV, Evans AT.** Evaluation of intraperitoneal and incisional lidocaine or bupivacaine for analgesia following ovariohysterectomy in the dog. *Vet Anaesth Analg.* 2004; 31(1): 46-52.
- Church DB, Nicholson AI, Ilkiw JE, Emslie DR.** Effect of non-adrenal illness, anaesthesia and surgery on plasma cortisol concentrations in dogs. *Res Vet Sci.* 1994; 56: 129-131.
- Çolak E, Yilmaz O.** Sprayed intraperitoneal and incisional lidocaine reduces early postoperative pain after ovariohysterectomy in dogs. *Kocatepe Vet J.* 2020; 13(4):396-405.
- Devitt CM, Cox RE, Hailey JJ.** Duration, complications, stress, and pain of open ovariohysterectomy versus a simple method of laparoscopic-assisted ovariohysterectomy in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2005; 227(6): 921-927.
- Distel M, Mueller C, Bluhmki E, Fries J.** Safety of meloxicam: a global analysis of clinical trials. *British J Rheumatol.* 1996; 35(Suppl 1): 68-77.
- Dow SW, Rosychuk RA, McChesney AE, Curtis CR.** Effects of flunixin and flunixin plus prednisone on the gastrointestinal tract of dogs. *Am J Vet Res.* 1990; 51: 1131-1138.
- Erel O.** A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochem.* 2004; 37: 277-285.
- Erel O.** A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Biochem.* 2005; 38: 1103-1111.
- European Coordination Committee for Veterinary Training** (2015). Day One Competencies. Brussels, Belgium: European Coordination Committee for Veterinary Training, https://www.eaeve.org/fileadmin/downloads/eccvt/2015_2_D1C_Adopted_Annex_5.4.1.pdf
- Firth AM, Haldane SL.** Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 214: 651-659.
- Fossum TW.** *Small Animal Surgery.* 3rd ed. St Louis: Mosby Elsevier, 2007: 709-713.
- Fox SM, Mellor DJ, Firth EC, Hodge H, Lawoko CR.** Changes in plasma cortisol concentrations before, during and after analgesia, anaesthesia and anaesthesia plus ovariohysterectomy in bitches. *Res Vet Sci.* 1994; 57: 110-118.
- Freeman LJ, Huse D, Lee R, Inoue T, Weil AB, Constable PD.** Teaching veterinary anesthesia and surgery: the impact of instructor availability on anesthesia, operative, and recovery times in dogs undergoing ovariohysterectomy or castration. *J Vet Med Edu.* 2014; 41(4): 390-399.
- Freeman LJ, Ferguson N, Fellenstein C, Johnson R, Constable PD.** Evaluation of learning curves for ovariohysterectomy of dogs and cats and castration of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2017; 251: 322-332.
- Gates MC, Odom TF, Sawicki RK.** Experience and confidence of final year veterinary students in performing desexing surgeries. *New Zealand Vet J.* 2018; 66(4): 210-215.
- Harris KP, Adams VJ, Fordyce P, Laddow J.** Comparison of surgical duration of canine ovariectomy and ovariohysterectomy in a veterinary teaching hospital. *J Small Anim Pract.* 2013; 54: 579-583.
- Hellyer PW, Frederick C, Lacy M, Salman MD, Wagner AE.** Attitudes of veterinary medical students, house officers, clinical faculty, and staff toward pain management in animals. *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 214: 238-244.
- Hewson CJ, Dohoo IR, Lemke KA.** Factors affecting the use of postincisional analgesics in dogs and cats by Canadian veterinarians in 2001. *Can Vet J.* 2006; 47: 453-459.
- Hill LN, Smeak DD, Lord LK.** Frequency of use and proficiency in performance of surgical skills expected of entry-level veterinarians by general practitioners. *J Vet Med Edu.* 2012; 240(11): 1345-1354.
- Hugonnard M, Leblond A, Keroack S, Cadore JL.** Attitudes and concerns of French veterinarians towards pain and analgesia in dogs and cats. *Vet Anaesth Analg.* 2004; 31: 154-163.
- Hunt JA, Heydenburg M, Anderson SL, Thompson RR.** Does virtual reality training improve veterinary students' first canine surgical performance? *Vet Rec.* 2020; doi: 10.1136/vr.105749
- Kim YK, Lee SS, Suh EH, Lee L, Lee HC, Lee HJ, Yeon SC.** Sprayed intraperitoneal bupivacaine reduces early postoperative pain behavior and biochemical stress response after laparoscopic ovariohysterectomy in dogs. *Vet J.* 2012; 191: 188-192.
- Koksal H, Kurban S.** Total oxidant status, total antioxidant status, and paraoxonase and arylesterase activities during laparoscopic cholecystectomy. *Clinics.* 2010; 65: 285-290.
- Korkmaz M, Yilmaz O, Saritas ZK, Demirkan I, Jaroszewski JJ.** Evaluation of intraperitoneal and incisional bupivacaine or levobupivacaine for postoperative analgesia in ovariohysterectomized dogs. *Acta Sci Vet.* 2019; 47: 1666.
- Kozlik J, Przybyłowska J, Mikrut K, Zukiewicz-Sobczak WA, Zwolinski J, Piątek J, Sobczak P.** Selected oxidative stress markers in gynecological laparoscopy. *Videosurgery Miniinv.* 2015; 10: 92-100.
- Kucukakin B, Gogenur I, Reiter RJ, Rosenberg J.** Oxidative stress in relation to surgery: is there a role for the antioxidant melatonin? *J Surg Res.* 2009; 152(2): 338-347.
- Langebæk R, Eika B, Tanggaard L, Jensen, AL, Berendt M.** Emotions in veterinary surgical students: a qualitative study. *J Vet Med Edu.* 2012; 39: 312-321.

- Lee JY, Kim MC.** Comparison of oxidative stress status in dogs undergoing laparoscopic and open ovariectomy. *J Vet Med Sci.* 2014; 76(2): 273-276.
- Lemke KA, Runyon CL, Horney BS.** Effects of preoperative administration of ketoprofen on anesthetic requirements and signs of postoperative pain in dogs undergoing elective ovariohysterectomy. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221(9): 1268-1275.
- Mathews K, Kronen PW, Lascelles D, Nolan A, Robertson S, Steagall PV, Yamashita K.** Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. *J Small Anim Pract.* 2014; 55(6): E10-E68.
- Michelsen J, Heller J, Wills F, Noble GK.** Effect of surgeon experience on postoperative plasma cortisol and C-reactive protein concentrations after ovariohysterectomy in the dog: a randomised trial. *Aust Vet J.* 2012; 90(12): 474-478.
- Odette O, Lesley JS.** A comparison of epidural analgesia provided by bupivacaine alone, bupivacaine + morphine or bupivacaine + dexmedetomidine for pelvic orthopedic surgery in dogs. *Vet Anaesth Analg.* 2013; 40: 527-536.
- Raekallio M, Heinonen KM, Kuussaari J, Vainio O.** Pain alleviation in animals: attitudes and practices of Finnish veterinarians. *Vet J.* 2003; 165: 131-136.
- Read EK, Vallevand A, Farrell RM.** Evaluation of veterinary student surgical skills preparation for ovariohysterectomy using simulators: a pilot study. *J Vet Med Edu.* 2016; 43(2): 190-213.
- Shaver SL, Larrosa M, Hofmeister EH.** Factors affecting the duration of anesthesia and surgery of canine and feline gonadectomies performed by veterinary students in a year-long preclinical surgery laboratory. *Vet Surgery.* 2019; 48: 352-359.
- Sies H.** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82: 291-295.
- Szymczyk G, Beltowski J, Marciniak A, Kotarski J.** Assessment of serum lipid peroxide levels and antioxidant status in females who had undergone total abdominal hysterectomy without closing of the peritoneum. *Ginekologia Polska.* 2003; 74: 1397-1403.
- Tsai TY, Chang SK, Chou PY, Yeh LS.** Comparison of postoperative effects between lidocaine infusion, meloxicam, and their combination in dogs undergoing ovariohysterectomy. *Vet Anaesth Analg.* 2013; 40(6): 615-622.
- Van Goethem BV, Okkens AS, Kirpensteijn J.** Making a rational choice between ovariectomy and ovariohysterectomy in the dog: A discussion of the benefits of either technique. *Vet Surgery.* 2006; 35: 136-143.
- Wetzel CM, Kneebone RL, Woloshynowych M, Moorthy K, Kidd J, Darzi A.** The effects of stress on surgical performance. *Am J Surgery.* 2006; 191(1): 5-10.
- Williams VM, Lascelles BDX, Robson MC.** Current attitudes of peri-operative analgesia in dogs and cats by veterinarians in New Zealand. *New Zealand Vet J.* 2005; 53: 193-202.
- Yilmaz O, Korkmaz M, Jaroszewski JJ, Yazici E, Ulutas E, Saritas ZK.** Comparison of flunixin meglumine and meloxicam influence on postoperative and oxidative stress in ovariohysterectomized bitches. *Polish J Vet Sci.* 2014; 17(3): 493-499.
- Zeugschmidt EL, Farnsworth CH, Carroll HS, Lucia TA, Hinckley MM, Gay JM, Cary JA.** Effects of an optional clinical skills laboratory on surgical performance of third-year veterinary students. *J Am Vet Med Assoc.* 2016; 248: 630-635.

Total Prostatectomy in a Dog with Perineal Hernia

M. İrem BAŞER¹, Yusuf ŞEN¹, Şevket ÖZVEREL^{1*}, Erfaneh PİRPAHAHİ¹, Ozan AHLAT¹,
Fati QOTİ¹, Ali BUMİN¹, Osman KUTSAL²

¹Ankara University, Veterinary Faculty, Surgery Department, 06110, Ankara, Turkey

²Ankara University, Veterinary Faculty, Pathology Department, 06110, Ankara, Turkey,

ABSTRACT

When perineal muscles separates, one or many organs of the pelvic and abdominal cavity displaces beneath skin and form swelling in different sizes, stiffnesses and forms. This is called perineal hernia. 10 years old, unneutered male Rottweiler dog operated because of swelling in the perineal area. In the operation, 9-10 cm structure of vasculated mass had been detected. Structure diagnosed as a prostate gland. Suspicion of malign enlargement leded to total prostatectomy and after anastomosis of cranial and caudal side of urethra. Area closed (sutured) in appropriate techniques. Patient became healthy without complication postoperatively. Histopathologic examination reveals subacute prostatitis with papillary hyperplasia of prostate and adenocarcinomatous lesions.

Keywords: Prostatectomy, Perineal Hernia, Dog.

Perineal Hernialı Bir Köpekte Total Prostatektomi Olgusu

ÖZ

Perineal kasların ayrılması sonucunda pelvik ve abdominal boşluk organlarının bir veya birkaçının perineal bölgede deri altına yer değiştirmesi sonucu bu bölgede değişik büyüklükte, kıvamda ve şekilde şişkinlik oluşturmasına perineal fitik denir. 10 yaşında, Rottweiler ırkı ve kısırlaştırılmamış erkek bir köpek, perineal bölgede gelişen şişkinlikten dolayı operasyona alındı. Operasyonda 9-10 cm boyutunda ve üzeri damarlı kitlesel bir yapı ile karşılaşıldı. İncelemede yapının prostat olduğu anlaşıldı. Kötü huylu bir büyüme olabileceği şüphesi üzerine total prostatektomi ve sonrasında üretranın kranial ve kaudal uçlarının anastomozu yapıldı. Bölge daha sonra tekniğine uygun olarak kapatıldı. Hastanın postoperatif olarak komplikasyonsuz iyileştiği görüldü. Histopatolojik inceleme sonucunda; papiller kistik prostat hiperplazisi ve adenokarsinomatöz odaklara sahip subakut prostatitis tanısı konuldu.

Anahtar Kelimeler: Perineal Hernia, Prostatektomi, Köpek.

To cite this article: Başer M.İ., Şen Y., Özverel Ş., Pirpanahi E., Ahlat O., Qoti F., Bumin A., Kutsal O. Total Prostatectomy in a Dog with Perineal Hernia. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):159-165

Submission: 22.09.2020 Accepted: 15.12.2020 Published Online: 26.02.2020

ORCID ID; MİB: 0000-0002-3784-9820, YŞ: 0000-0002-8137-3858, ŞÖ: 0000-0002-5997-1608, EP: 0000-0003-0427-6517, OA: 0000-0002-2580-8140, FQ: 0000-0001-5751-0675, AB: 0000-0001-8468-1330, OK: 0000-0003-3599-6867

*Corresponding author e-mail: sevk.ozverel@hotmail.com

GİRİŞ

Perineal bölgeyi oluşturan kasların değişik nedenlerden dolayı ayrılması sonucu pelvik ve abdominal boşlukta bulunan organların bir veya birkaçının perineal bölgede deri altına toplanarak farklı büyüklük, şekil ve kıvamda şişkinlik oluşturmasına perineal fitik denir. Fitik kesesi içerisinde pelvik veya retroperitoneal yağ dokusu, seröz sıvı, deviye olmuş ya da dilate rektum, rektal divertikulum, prostat, idrar kesesi veya ince bağırsaklar bulunabilir (Head ve Francis 2002, Bennett 2018).

Perineal kas diyaframının zayıflaması ve intrapelvik bağ dokusu yapılarının esnemesi sonucunda bozulan anatomik yapı kaudal abdominal organların (idrar kesesi, prostat) herniasyonuna, rektumun deviasyonuna ve divertikülüne yol açar (Bellenger ve Canfield 2003). Perineal hernia çoğunlukla yaşlı kısırlaştırılmamış erkek köpeklerde görülür. Hormonal etkiler, perineal kas sisteminin üzerinde zayıflatıcı etkiye sahiptir. Neden olan diğer faktörler arasında rektal hastalık, prostatomegali ve perineal diyaframın anatomik bozukluğu yer almaktadır. Perineal herniasyon hemen hemen sadece yaşlı erkek köpeklerde gelişir, bu durum erkek ve dişi köpekler arasındaki olası anatomik ve hormonal etki farkını gösterir (Head ve Francis 2002).

Perineal bölgedeki şişlik unilateral ya da bilateral olabilir. Bu bölgedeki anal bezlerin hastalıkları ya da tümörleri ile karışabilir. Hastalığın kesin tanısı ve bölgenin diğer hastalıklarından ayırıcı tanısı için klinik, radyografik ve ultrasonografik muayene yapılmalıdır. Tanı konulduktan sonra sağaltımı cerrahi olarak yapılmalıdır (Head ve Francis 2002, Fossum 2013).

Bu olguda, perineal hernial bir köpekte ilk kez prostatın fitikleşmesi ile karşılaştık. Bunun sağaltımı ve sonuçlarını meslektaşlarımız ile paylaşmayı amaçladık.

Olgu Tanımı

İncelediğimiz olgu 10 yaşında, Rottweiller ırkı, kısırlaştırılmamış bir erkek köpektir. Olgu Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Kliniği'ne, Ankara dışında özel bir klinikten acil olarak sevk edilmiş olarak geldi. Hasta sahibinden alınan anamnezde, iki hafta öncesinde perineal bölgede yavaş yavaş büyüyen bir şişkinlikten dolayı köpeğini özel bir kliniğe götürdüğü ve muayenede Veteriner Hekim tarafından soğuk apse tanısı konulduğu bilgileri alındı. Hasta sahibi anamnezinde sağaltım amacıyla lokal olarak pomad iyot iyodür başlandığı ve iki hafta kullandıktan sonra tekrar gelmeleri söylendiğini bildirdi.

İki hafta pomad kullanımı sonunda hastanın kliniğe tekrar götürüldüğü ve bu bölgeye Veteriner Hekim tarafından punksiyon yapıldığı ancak punksiyon iğnesinden içerik gelmemesi sonucu hastanın Ksilazin hidroklorür (2 mg/kg, BASİLAZİN %2- Ksilazin hidroklorür 23,32 mg, Bavet, Türkiye) ve Ketamin

hidroklorür (10 mg/kg, Ketamol %10- Ketamin hidroklorür 100 mg. Benzetoniyum klorür 0,1 mg, İnterhas, Türkiye) ile anesteziye alınıp bölgeye cerrahi girişimde bulunulduğu bilgisi alındı.

Cerrahi girişim sonrasında bölgede oldukça çok kan damarına sahip solid bir kitlenin Veteriner Hekim tarafından görülerek kitleye herhangi bir girişimde bulunamayacağını söylemesi sonucu var olan kanamaların elektrokoter ile durdurulmaya çalışıldığı ve deriye basit ayrı dikiş atılarak acilen kliniğimize yönlendirildiği öğrenildi.

İnspeksiyonda, perineal bölgede anüsün sağ üst tarafına dikiş atıldığı ve bu bölgede sızıntı tarzında kanama olduğu tespit edildi. Palpasyonda şişliğin belirgin ve sert olmasından dolayı köpeğin acilen operasyona alınmasına karar verildi.

Perianal bölge geniş bir şekilde tıraş edildikten sonra antisepsi işlemleri yapıldı. Rutin cerrahi hazırlıktan sonra anestezi indüksiyonu için 6 mg/kg Propofol (Propofol® %1 Fresenius İlaç San. İtalya) bolus şeklinde intravenöz olarak uygulandıktan sonra operasyon süresince %3-3,5 konsantrasyonunda Isofluran (Isoflurane USP® Adeka İlaç San., Hollanda) %100 oksijen ile birlikte verilerek idame anestezisi sağlandı.

Hasta operasyon masasına sternal pozisyonda yatırıldı ve pelvis bölgesi operasyon kolaylığı için yukarıya kaldırıldı. Hastaya perioperatif analjezi amacıyla (morfin 0,01 mg/kg sc Morphine® Osel İlaç San. İstanbul) ve antibiyoterapi amacıyla (sefalosporin 20 mg/kg iv (Cefozin® Bilim İlaç San. İstanbul) ilaçlar uygulandı.

Operasyona bölgede bulunan ve daha önceki klinikte Veteriner Hekim tarafından atılan dikişler alınarak başlandı. Bölgede bulunan dikişler uzaklaştırıldıktan sonra perineal bölgedeki kasların normal anatomik yapısının kaybolduğu ve bölgede yaklaşık tenis topu büyüklüğünde 9-10 cm boyutunda vaskülizasyonu fazla, multi-lobüler kitlesel bir yapı olduğu görüldü (Şekil 1). Yapılan palpasyon ve inspeksiyon ile kitle incelendiğinde bu yapının prostat olduğu anlaşıldı.

Köpeğin yaşı da göz önüne alındığında kötü huylu bir büyüme olabileceği düşüncesi ile Total Prostatektomi operasyonu yapılmasına karar verildi. Bunun üzerine idrar kesesine idrar yolu kateteri yerleştirildi. Kateterinin kılavuzluğunda prostatın kranial ve kaudalinde bulunan üretra penslerle tutulduktan sonra prostat total olarak bölgeden uzaklaştırıldı.

Prostatın tamamen uzaklaştırılmasından sonra üretranın kranial ve kaudal uçlarının uç uca anastomozu, 4/0 PDS ile basit ayrı dikişler atılarak yapıldı (Şekil 2). İdrar kesesi üzerinde iatrojenik olarak oluşturulan 1-2 cm'lik ensizyon 4/0 PDS ile Schmieden ve Lembert dikişleri ile kapatıldı.

Daha sonra prostat ile beraber fitikleşmiş olan idrar kesesi normal anatomik yerine yerleştirildi (Şekil 3). Bölgeyi oluşturan perineal kasların rekonstrüksiyonu, anatomik konumları korunarak 0 prolen dikiş materyali ile basit ayrı ve sürekli dikişlerle sağlandı.

Derialtı bağ doku ve deri tekniğine uygun olarak kapatıldı. Uygulanan sonda üretrada bırakıldı ve Chinese Finger Trap dikişleri ile prepisyuma sabitlendi.

Perianal bölge fitıklarının nedenleri arasında sayıldığı için hastaya anestezi altındayken kastrasyon operasyonu da yapıldı. Hasta anesteziden uyandıktan sonra yakalık takılarak hasta sahibine teslim edildi.

Postoperatif antibiyoterapi için amoksisilin klavulanik asit (20 mg/kg, oral) yedi gün için reçete edildi. Bölgedeki kasların ve dikişlerin zorlanmaması için hastanın ıkmamasını engellemek amacıyla, hastanın en az 10 gün süreyle yumuşak gıdalarla beslenmesi önerildi.

Hastanın 3. 5. ve 15. gün kontrollerinde herhangi bir postoperatif komplikasyon geliştirmediği, ürinyasyon ya da defekasyonda sıkıntı yaşamadığı ve operasyon bölgesinin de herhangi bir komplikasyon şekillenmeden iyileştiği tespit edildi. Hastanın akciğer radyografisi alınarak ve abdominal ultrasonografisi yapılarak metastaz açısından değerlendirme yapıldı. İdrar kesesine yerleştirilmiş olan kateter 5. günde çıkarıldı.

Prostatın patolojik incelemesi için alınmış olan prostat %10'luk formalinde 24 saat süre ile tespit edildikten sonra doku takip cihazında (Leica TP1020) dereceli alkollerden ve ksilolden geçirilerek parafine bloklandı (Thermo Shandon Histocentre 3). Bloklardan alınan (Leica RM2255) 5 µm'lik kesitler Hematoksilen ve Eozin (HE) boyası ile boyandı (Leica Autostainer XL) ve entellan ile kapatıldı (Leica CV5030). Hazırlanan preparatlardan kameralı ışık mikroskopunda (Olympus BX51-DP71) mikrofotograflar çekildi.

Prostatın makroskopik muayenesinde; 80 gr ağırlığında ve 6 cm çapında olup, hafif yumuşak-elastiki kıvama sahip olduğu ve kesit yüzü sarımsı-boz beyaz renkte ve multilobüler görünümde olduğu rapor edildi (Şekil 4).

Mikroskopik incelemede bezlerin lumene doğru papiller tarzda üremeler gösterdiği ve yer yer kistik görünümde oldukları dikkati çekti. Bazı mikroskop sahalarında hiperplazik bez yapılarının epitel hücre çekirdekleri hiperkromatik ve atipik görünümdeydi (Şekil 5). Ayrıca bezlerin arasında ödem, çoğunlukla nötrofil lökosit, plazma hücresi ve makrofajlardan oluşan aralarında tek tük lenfositlerin de yer aldığı yangısal hücre infiltrasyonları ile birlikte bağ doku artışı ve kanama alanları da fark edildi. Yangısal hücrelere bez lumenlerinde de rastlandı.

Alınmış olan prostatın patolojik incelemesi sonucunda papiller kistik prostat hiperplazisi ve adenokarsinomatöz odaklara sahip subakut prostatitis tanısı konuldu ve total prostatektomi operasyonu ile malign odaklarının ilerlemesi ve yayılımının önüne geçildiğine karar verildi.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Perineal hernialarda bölgenin anatomik konumundan dolayı değişik organlar fitıklaşabilir. Bilbrey ve ark.

(1990) yaptıkları çalışmada idrar kesesinin ve prostatın fitıklaşmasının perineal herniaya sahip olan köpeklerin %18'inde görüldüğünü bildirmelerine karşın, bu raporda belirtilen köpek bizim kliniğimizde karşılaşılan ve kayıtlarda bulunan prostatın perineal herniadan fitıklaştığı ilk olgudur. Çalışmalarda idrar kesesi fitıklaşması olan hayvanlarda sıklıkla perineal hernia ile görülen kabızlık ve perineal bölgedeki şişkinliğe ek olarak idrar tıkanıklığı belirtileri görülebildiği söylenmektedir ancak bizim olgumuzda operasyon öncesi perineal bölgede şişkinlik dışında hiçbir klinik belirti bulunmamaktaydı. Perineal hernia operasyonlarından sonra idrar kesesi ve prostatın tekrar fitıklaşmasının önlenmesi adına duktus deferenslerin fizyasyonu ya da idrar kesesinin abdominal duvara sabitlenmesi gibi birçok yöntem uygulanabilmektedir (Bilbrey ve ark. 1990). Bizim olgumuzda kastrasyon yapılmış olması, prostatın total rezeksiyonu ve üretranın kısalması sebebiyle herhangi bir organın fizyasyonuna ihtiyaç duyulmamış ve nüks görülmemiştir.

Prostat neoplazisi köpeklerde nadir olarak görülür ve en sık görülen histolojik tümör tipi adenokarsinomdur. Daha az yaygın olan epitelyal menşeli tipler arasında skuamöz hücreli karsinom, değişken hücreli karsinom ve farklılaşmamış karsinom bulunmaktadır. Leiomyom, leiomyosarkom ve hemanjiyosarkom gibi mezankimal tümörler nadirdir. Köpeklerde prostatı etkileyen tümörler arasında ayrıca lenfoma da bildirilmiştir (Watanabe ve ark. 2018, Lawrence 2012). Köpeklerde prostat hastalıkları özellikle 5 yaş ve üzeri, Alman Çoban ve Rottweiller gibi büyük ırklarda görülmektedir (Fossum 2013, Bellenger ve Canfield 2003). Bu çalışmalara bakıldığında bizim olgumuzun Rottweiller ırkı ve 5 yaş üstünde bir köpekte görülmesi ayrıca patolojik tanının adenokarsinom olması diğer çalışmalarla uyumludur.

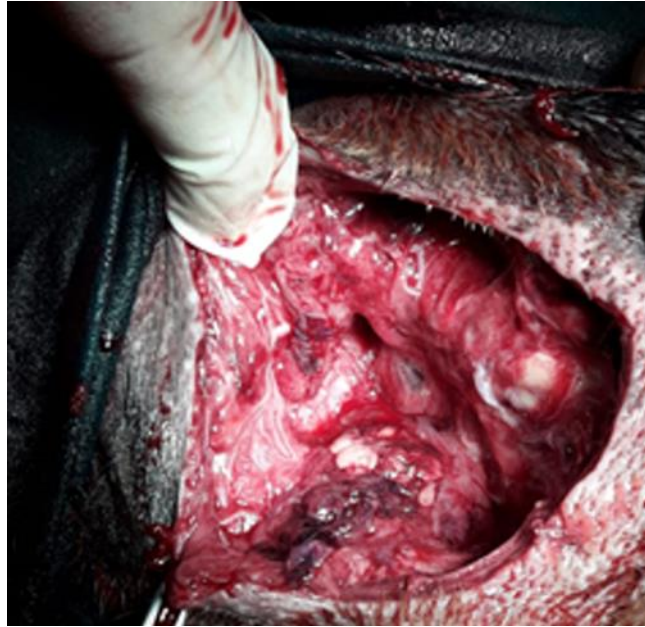
Total prostatektomi, metastaz yapmamış tümörleri olan hastalar için kullanılabilir; ancak diğer sağaltımlara yanıt vermeyen şiddetli travma veya kronik prostat hastalığı için nadiren uygulanır. Operasyon sonrası hastada üriner inkontinans sık görülür ve tanı anında prostatik tümörlerin metastaz yapmış olma oranları çok yüksek olduğunda da bu prosedür nadiren yapılır (Fossum 2013, Cornell ve ark. 2000). Bizim olgumuzda operasyona girerken prostatektomi yapma planı olmasa dahi prostatın patolojik incelemesi sonucu adenokarsinom görüldüğü için total olarak alınmasının hastanın operasyon sonrası yaşam kalım süresini uzattığı görülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda üriner inkontinans, tüm olguların %33 ile %100'ünde bildirildiği gibi total prostatektomi sonrası en sık görülen komplikasyondur (Freitag ve ark. 2007, Goldsmid ve Bellenger 1991). Ancak bizim olgumuzda operasyon sonrası inkontinansa rastlanılmamıştır bu durum Goldsmid ve Bellenger (1991) çalışması ile uyumlu görülmektedir. Goldsmid ve Bellenger (1991) prostatik hastalığı olan 11 köpekte

total prostatektomilerden sonra %33'lük bir inkontinans oranı rapor ettiklerini bildirdiler. Bu durum, diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında daha düşük inkontinans oranının, prostat duvarına yakın dikkatli diseksiyondan, önemli nörovasküler yapıların zarar görmesinden kaçınılmasından ve prostatın hem kranial hem de kaudal uçlarının mümkün olduğunca az eksize edilerek daha fazla prostatik idrar yolunun korunmasına özen gösterilmesinden kaynaklanmış olabilir (Goldsmid ve Bellenger 1991). Yazarlar ayrıca preoperatif inkontinans ile prostatik neoplazi ve postoperatif inkontinans arasında bir ilişki olabileceğini bildirdiler. Çalışmada postoperatif idrar inkontinansı görülen üç köpekten birinde başvuru şikayeti olarak idrar inkontinansı, diğerinde prostatik neoplazi, bir diğer köpekte ise prostatik neoplazi ve preoperatif idrar inkontinansı şikayeti olduğu rapor edildi. Çalışmada diğer köpeklerin çoğu prostatitis için total prostatektomi geçirdi (Goldsmid ve Bellenger 1991). İlginç bir şekilde, prostatik hastalığı olmayan köpeklerde total prostatektomiye değerlendiren bir çalışmada, 10 köpeğin hiçbirinin postoperatif dönemde inkontinans yaşamadığı bildirildi ve bu durum inkontinansın cerrahi ile kombine olan altta yatan prostatik hastalık ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Vnuk ve ark. 2008, White 2000).

Bu yüksek komplikasyon oranı nedeniyle, total prostatektomi genellikle önerilmemektedir. Ancak, prostatektomi prostatik neoplazili köpekler için daha uygun bir seçenek haline gelebilir, çünkü sağaltım daha kesindir ve erken tanı ile cerrahiye daha yatkın küçük lezyonlar yakalanabilir (Freitag 2007). Total prostatektomi, yardımcı sağaltımlar ile kombine edildiğinde, prostat kansinömlü köpeklerin önceki raporlarına göre yaşam süresini uzatır ve komplikasyon oranlarını azaltır. Bununla birlikte, olgu seçiminin postoperatif sonuçta önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir (Bennett 2018).

Olgumuzdaki gibi acil ameliyata ihtiyaç duyulmayan olgularda, mutlaka operasyon öncesi fitik bölgesinin ultrasonografik değerlendirilmesinin yapılması operasyon planlamasını yapabilmek açısından önemlidir. Tümör görülen olgularda, tümörden biyopsi örneğinin alınması, yine preoperatif akciğer radyografilerinin alınması ve kan analizlerinin yapılması, metastaz değerlendirmesinde ve olguya yaklaşım stratejisinin belirlenmesinde büyük önem taşıdığını düşünmekteyiz.

Bu olgu sunumunda kliniklerimizde sıklıkla karşılaşılan perineal hernia hastası köpekler arasında kliniğimizde ilk defa prostatın fıtıklaşmış olduğu bir olgu ile karşılaştık. Bu olgunun sağaltımını ve sonuçlarını meslektaşlarımız ile paylaşmayı amaçladık.



Şekil 1: Bölge açıldığında karşılaşılan prostatın fıtıklaştığının görüldüğü fotoğraf.

Figure 1: Image that shows herniated prostate after incision of the area.



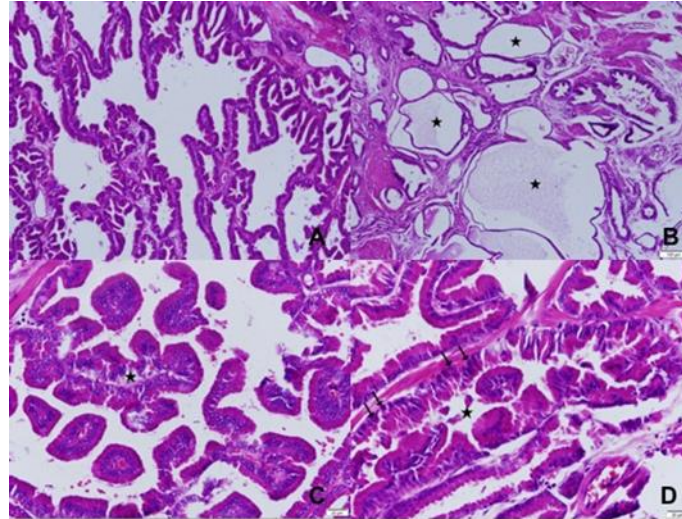
Şekil 2: Üretral anastomoz yapılırken; üretradan geçirilen ve idrar kesesinden çıkarılan kateter görülmekte.
Figure 2: During urethral anastomosis; catheter shown that passes from urethra and exits from urinary bladder.



Şekil 3: Total prostatektomiden sonra bölgede bulunan perineal açıklığın görüntüsü.
Figure 3: Perineal space image after total prostatectomy.



Şekil 4: Alınan prostatın makroskopik görüntüsü.
Figure 4: Macroscopic image of extirpated prostate.



Şekil 5 A: Prostat bezinde papiller hiperplazi, HE. B. Prostat bezinde papiller hiperplazi (yıldız), HE. C. Kistik prostat bezleri (yıldızlar), HE. D. Prostat bezinde adenokarsinomatöz odak (yıldız), hiperkromatik ve atipik görünümdeki hücreler (oklar), HE.

Image 5 A: Papillary hyperplasia of prostate gland, HE. B. Papillary hyperplasia of prostate gland (star), HE. C. Cystic prostate glands (stars), HE. D. Adenocarcinomatous focal area (star), hyperchromatic and atypical cells (arrows) of prostate gland HE.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Etik izin: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği HADYЕК iznine tabi değildir.

KAYNAKLAR

- Agnew DW, MacLachlan NJ.** Tumors of the Genital Systems, In: Tumors in Domestic Animals, Ed; Meuten DJ, 5th Ed., John Wiley & Sons, Inc., Ames, Iowa, USA. 2017; pp. 714-717.
- Bellenger CR, Canfield RB.** Perineal Hernia, In: Textbook of small animal surgery, Ed; Slatter DH, 3rd Ed., Elsevier health sciences, USA. 2003; pp. 487-497.
- Bennett TC, Matz BM, Henderson RA, Straw RC, Liptak JM, Selmic LE, Collivignarelli F, Buracco P.** Total prostatectomy as a treatment for prostatic carcinoma in 25 dogs. *Vet Surg.* 2018; 47(3):367-377.
- Bilbrey SA, Smeak DD, DeHoff W.** Fixation of the deferent ducts for retrodisplacement of the urinary bladder and prostate in canine perineal hernia. *Vet Surg.* 1990; 19(1):24-7.
- Cornell KK, Bostwick DG, Cooley DM, Hall G, Harvey HJ, Hendrick MJ, Pauli BU, Render JA, Stoica G, Sweet DC, Waters DJ.** Clinical and pathologic aspects of spontaneous canine prostate carcinoma: a retrospective analysis of 76 cases. *Prostate.* 2000; 45(2):173-83.
- Freitag T, Jerram RM, Walker AM, Warman CGA.** Surgical management of common canine prostatic conditions. *Compend Contin Educ Vet.* 2007; 29(11):656-672.
- Goldsmid SE, Bellenger CR.** Urinary incontinence after prostatectomy in dogs. *Vet Surg.* 1991; 20(4):253-6.
- Head LL, Francis DA.** Mineralized paraprostatic cyst as a potential contributing factor in the development of perineal hernias in a dog. *J Am Vet Med Assoc.* 2002; 221(4):533-535.
- Johnston SD, Kamolpatana K, Root-Kustritz MV, Johnston GR.** Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61:405-15.
- Lawrence JA, Saba CF.** Tumors of the male reproductive system, In: Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology, Ed; Withrow SJ, Vail DM, Page RL, 5th Ed., Elsevier Inc., USA. 2012; pp. 557-571.
- Polisca A, Troisi A, Fontaine E, Menchetti L, Fontbonne A.** A retrospective study of canine prostatic diseases from 2002 to 2009 at the Alfort Veterinary College in France. *Theriogenology.* 2016; 85(5):835-840.
- Radlinsky MG.** Chapter 20: Surgery of the Digestive System, In: Small Animal SURGERY, Ed; Fossum TW, Dewey CW, Horn CV, Johnson AL, MacPhail CM, Radlinsky MG, Schuls KS, Willard MD, 4th Ed., Elsevier Mosby, Missouri, USA. 2013; pp. 568-573.
- Smith J.** Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis and treatment. *Theriogenology.* 2008; 70:375-83.
- Vnuk D, Lipar M, Matičić D, Smolec O, Pećin M, Brkić A.** Comparison of standard perineal herniorrhaphy and transposition of the internal obturator muscle for perineal hernia repair in the dog. *Veterinarski arhiv.* 2008; 78(3):197-207.
- Watanabe K, Iwasaki R, Kondo S, Ohuchi T, Shibata S, Sakai H, Yamazoe K.** A case of prostate B-cell lymphoma recognized in the contents of an irreducible perineal hernia in a dog. *J Vet Med Sci.* 2018; 80(5):784-789.
- White, RA.** Prostatic surgery in the dog. *Clin Tech Small Anim Pract.* 2000; 15(1):46-51.

Case of Fetal Maceration in a Dog

Ece TUNÇ^{1*}, Hacı Ahmet ÇELİK¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynecology, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

Fetal maceration is a process which is characterized by enzymatic autolysis of cells and degeneration of connective tissue. In this case, fetal maceration was described in a female dog. A 22 months old, 32 kg female Golden Retriever dog was brought to the Animal Hospital of Afyon Kocatepe University with the complaints of whitish and foul-smelling vaginal discharge, anorexia and weakness nearly two months. The body temperature, respiratory and pulse rates were at normal values. In the ultrasound examination, hyperechogenic areas were detected in the uterus. Before the ovariohysterectomy operation, an adhesion was determined between left uterine horn and the omentum. Furthermore, a huge solid and vascularized structure was detected in the left horn. After removal of the ovaries and the uterus, a foul-smelling mucous structure of brown-reddish fluid and fetal bone residues were found after incision and inspection to the uterus. Considering all findings, the patient was diagnosed with fetal maceration. In the postoperative period, the process was supported with systemic antibiotics and periodic wound care for the first seven days, recovery was achieved and no complications were encountered in the next six months. Since the case is rarely seen, veterinarians should not overlook this problem in bitches and they are recommended to use ultrasound in examinations.

Keywords: Dog, Fetus, Maceration, Ovariohysterectomy, Ultrasonography.

Bir Köpekte Fetal Maserasyon Olgusu

ÖZ

Fetal maserasyon hücrelerin enzimatik otolizi ve bağ dokusunun dejenerasyonu ile karakterize edilen bir süreçtir. Sunulan olguda dişi bir köpekte fetal maserasyon aktarıldı. 22 aylık ve 32 kg olan Golden Retriever ırkı bir köpek yaklaşık 2 aydır vulvadan gelen akıntı, iştahsızlık ve halsizlik şikâyetiyle Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Hastanesi'ne getirildi. Köpeğin vücut ısısının, solunum ve nabız sayılarının normal değerlerde olduğu ancak vajinal akıntının kötü kokulu ve beyazımtırak renkte olduğu görüldü. Ultrason muayenesinde uterusu hiperekojenik alanların olduğu gözlemlendi. Hastaya yapılan ovariohisterektomi operasyonu öncesinde uterusun sol kornusunda sert büyük bir kitlesel yapının yoğun damarlaşma ile birlikte şekillendiği, ayrıca bu kornunun omentuma adezyon oluşturduğu tespit edildi. Ovaryumlar ve uterus uzaklaştırıldıktan sonra uterusu yapılan enzisyon ve inspeksiyonda kötü kokulu muköz yapıda kahverengi-kırmızımsı renkte sıvı ile fetal kemik kalıntıları bulundu. Tüm bulgular değerlendirildiğinde hastaya fetal maserasyon teşhisi konuldu. Dişi köpeklerde nadir görülen bir vaka olduğu için için veteriner hekimlerin muayenelerde ultrason kullanmaları ve bu problemi göz önünde bulundurmalarının önemi üzerinde duruldu. Postoperatif dönemde, ilk yedi gün sistemik antibiyotikler ve periyodik yara bakımı ile süreç desteklendi ve sorunsuz bir şekilde iyileşme sağlandı ve sonraki ilk altı aylık dönemde herhangi bir komplikasyona rastlanmadı.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Fetus, Maserasyon, Ovariohisterektomi, Ultrasonografi.

To cite this article: Tunç E., Çelik H. A. A Case of Fetal Maceration in a Dog. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):166-170

Submission: 24.07.2020 Accepted: 19.02.2021 Published Online: 26.02.2021

ORCID ID; ET: 0000-0001-6913-4961, HAÇ: 0000-0002-7934-3123

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

INTRODUCTION

Prenatal development consists of three stages in dogs. When the ovulation is accepted to take place on the day of 0; the first period (2-17 days) is pre-implantation stage, the second period (19-35 days) is the embryonic stage and the third period (35th day to birth) is the fetal stage. The embryo or fetus may lose its life function due to many reasons that can be hardly detected in every period of pregnancy (Alaçam 2010). In the prenatal development period, the damage of the embryo or fetus is resulted with the embryonic or fetal losses (Bozkurt et al. 2018). The resorption of embryo occurs after embryonic death process, but emphysema, mummification or maceration of the fetus is seen in subsequent fetal period (Alaçam 2010). In some circumstances where abortion cannot occur due to uterine inertia or intrauterine infections, soft tissues of the fetus are autolysed and separated from bone tissues as a result of bacterial contamination of the dilated cervix (Serin and Parin 2009, Bhattacharyya et al. 2015). The incidence of fetal maceration is high in cattle and very low in dogs (Bozkurt et al. 2018). The studies on fetal maceration are limited and some case reports have been provided (Erdoğan et al. 2019).

CASE HISTORY

A 22 months old, 32 kg female, Golden Retriever breed dog was brought to Afyon Kocatepe University Animal Hospital with complaints of vaginal discharge which had been seen for almost two months, non-severe anorexia and weakness. In the preoperative clinical examination; it was determined that the body temperature was 38.7 °C, the respiratory rate was 22/min, the pulse rate was 74/min, the mobility level and the appearance of its mucous membranes were normal. Preoperative blood parameters were seen as among the reference values. It was seen that the vaginal discharge was foul-smelling and whitish in color. The imaging of hyperechogenic areas consistent with fetal bones in the uterus were detected as mixed and intertwined in the transabdominal ultrasound examination. No fluid was seen in the uterus. The existence of a fetus was not understood from this image. These areas were considered as unusual structures that should not be in the uterus (Figure 1).

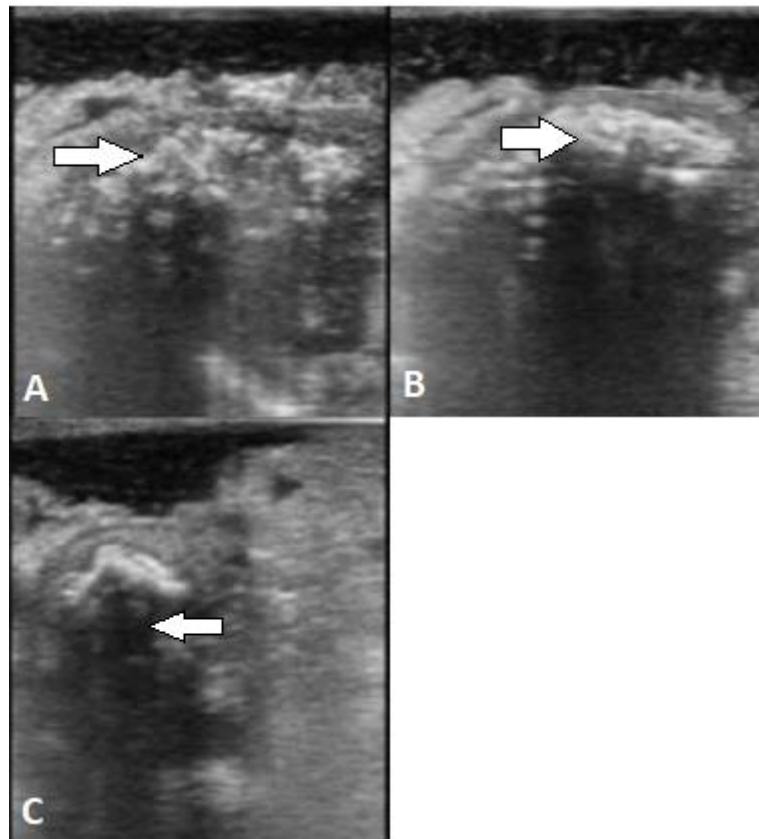


Figure 1: Hyperechogenic area in the uterus (A), Hyperechogenic area in the uterus (B), Mucous fluid in the uterus (C).

After observations and examinations, it was decided to perform ovariectomy. After premedication with butorfanol (Butamidol®; İnterhas, Türkiye) [0,1mg/kg; Intramuscular (IM)] and medetomidine (Domitor®;Vetequinol, UK), anesthesia was started with propofol (Propofol®; Fresenius Kabi, Türkiye) (2.5 mg/kg; Intravenous (IV)). Inhalation anesthesia was continued with the support of isoflurane (Forane Likit®; Abbott, US) (1-1.5%) and oxygen (1 l/min). The venous catheterization was performed before the surgery and the risk of hypovolemia was brought under control with the support of 0.9% NaCl (Polifarma®; Türkiye) solution during the surgery. The patient was fixed to the surgery table on dorsal recumbency and prepared for aseptic surgery. The umbilical scar was detected and the incision region was adjusted as the line corresponding to two-thirds

middle of the line. The uterus was reached after the incision. It was observed that there was intense vascularization throughout the uterus, solid structure formation in the left uterine horn and a part of the omentum was attached. Uterine tissue and ovaries were removed by under control of bleeding under control and ligaturing with 1 and 0 polyglycolic acid (PGA) (Pi Surgical sutures®; Pi sutures, England). The inspection of the uterus, brown-reddish, foul-smelling, content of mucous fluid and fetal bone were observed (Figure 2). The pathological and anatomical features of the hard structure formed in the uterine horn have brought the idea of the diagnosis maceration of the fetus. Based on macroscopic findings, it was suggested that there were three or more macerated fetuses in the uterus (Figure 3).

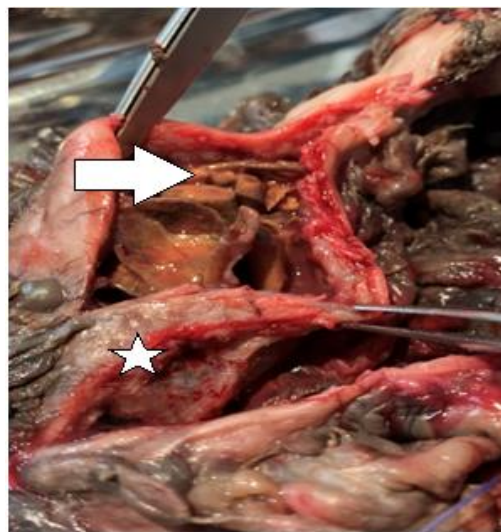


Figure 2: The appearance of uterine contents.
Fetal bones in uterine left horn (arrow).
Left Uterine horn (star).



Figure 3: The appearance of fetal bones.

Peritoneum, muscles and the skin closure were completed by 1 and 0 PGA using simple interrupted stitches. Postoperative care was maintained and defecation and urination were observed approximately 15 hours after the surgery. Body temperature was measured as 38.9° C, respiratory rate 20/min, pulse rate 69/min. For postoperative treatment, the patient underwent IM ceftriaxone sodium (Novosef 0.5g®; Sanofi, Türkiye) (5mg/kg) injection for 7 days, and operation site wound care were performed. No complication was observed in the patient throughout six months.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The use of ultrasonography in dogs is very important for the diagnosing early pregnancy, the determination of the viability of the fetus, the interpretation of the physiology or pathology of the genital organs, the prediction of the number, age and sex of fetus, the time of delivery and the imaging of postpartum uterus (Şendağ et al. 2003, Yılmaz et al. 2006, Erdoğan et al. 2019).

While it has been stated in two different case reports that the swelling and tension in the mammary glands in the abdominal region were remarkable (Begum et al. 2019, Erdoğan et al. 2019), no swelling and tension in the mammary glands was evident in the presented case. Although no foul-smelling vaginal discharge has been reported due to the closed cervix in other cases (Begum et al. 2019, Erdoğan et al. 2019), mucous-smelling whitish secretion was observed in the presented case. This suggests that the cervix was open in the presented case.

The character of vaginal discharge which was seen in this case was mucous, malodorous, whitish color. However, it was reported that the hemorrhagic, malodorous or dark brown vaginal discharge might be evident in some cases (England 1998, Johnston et al. 2001, Bodh et al. 2014). Bodh et al. (2014) reported the adhesions that formed with uterine rupture and they suggested that it may be seen depending on the use of oxytocin, although adhesive areas in the uterus and omentum were detected without uterine rupture in our case as reported by Sagar et al. (2017). While the body temperature was within the reference values in the presented case, the pyrexia was observed in the cases Begum et al. (2019) and Erdoğan et al. (2019). In the presented case, the fact that its body temperature did not increase was associated with the blood parameters were in the range of normal reference values and its general condition was not yet impaired. Fetal maceration may occur due to prolonged pregnancies caused by progestin injections (Gonzalez Dominguez and Maldonado-Estrada. 2006). However, in the presented case progesterone administration was not in question. Similarly, Bodh et al. (2014) reported that

fetal maceration was encountered without the use of progestins.

In conclusion, veterinarians should perform regular gynaecological examinations on pregnant dogs even if they do not show any clinical signs rather than vaginal discharge. It was suggested that by using ultrasonography, early diagnosis and accurate treatment can be performed in related cases.

Conflict of Interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

Ethical Statement

This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with Article 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

REFERENCES

- Alaçam E.** Evcil hayvanlarda doğum ve infertilite. Medisan Yayınevi Tıbbi Alet ve İlaç Kimyasal Mad. ISBN:975-7774-37-5. 2010; 127.
- Begum MM, Roshini ST, Bhuvaneshwari V.** Management of fetal maceration in a 2-year-old Toy Poodle. Indian Veterinary Journal. 2019; 6(06): 57-58.
- Bhattacharyya HK, Dar SA, Fazili MR.** Fetal maceration in Crossbred Holstein Frisian heifer-A case report. International Journal of Veterinary Sciences Research. 2015; 1(1): 1-4.
- Bodh D, Gugjoo MB, Abu Rafee M, Singh K.** Uterine rupture and fetal maceration in an Indian Mongrel Bitch. Journal of Advanced Veterinary Research. 2014; 4(1): 49-52.
- Bozkurt G, Sidekli O, Aksoy G, Cortu A, Agaoglu AR** The case of fetal maceration in two different bitches. Journal of Veterinary Science and Animal Husbandry. 2018; 6(1): 104. doi: 10.15744/2348-9790.6.104
- England, G.** Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy termination. In: England G, Harvey M (ed's), Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology. BSAVA Manuals, Hampshire. 1998; 118-119.
- Erdoğan G, Akkuş T, Payan-Carreira R.** An unusual outcome for fetal death in bitch: a report of a case. Journal of Advances in Vet Bio Science and Techniques. 2019; 4(1): 22-25.
- González-Domínguez MS, Maldonado-Estrada JG.** Prolonged pregnancy associated to an inappropriate medroxyprogesterone acetate prescription in a bitch: Is rational and ethics the use of exogenous progestin in the bitch? Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2006; 19: 442-450.

- Johnston SD, Kusritz MVR, Olson PNS.** Canine pregnancy.
In: Johnston SD (Ed), Canine and Feline Theriogenology.
Philadelphia, W.B. Saunders. 2001; 88.
- Johnston SD, Raksil S.** Fetal loss in the dog and cat. Veterinary
Clinics of North America: Small Animal Practice. 1987;
17(3): 535-554.
- Sagar PV, Kumar PR, Raghunath M.** Ectopic fetal maceration
in a Labrador bitch. Livestock Science. 2017; 8: 8-10.
- Şendağ S, Taşal I, Aydın I, Çelik HA, Alan M.** Köpeklerde
real-time ultrasonografinin reproduktif kullanım alanları.
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.
2003; 14(2): 57-63.
- Yılmaz O, Uçar M, Çelik HA.** Köpeklerde ovaryumların
ultrasonografik ve postoperatif muayeneleri. Uludağ
Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 2006; 25(1-2): 1-
7.

Clinical, Ultrasonographic and Pathologic Evaluation of Cystic Mucinous Gallbladder in a Dog

Mustafa KABU¹, Mehmet Fatih BOZKURT², Durmuş Fatih BAŞER¹, C. Çağrı CINGI^{1*}

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

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 03200, Afyon, Turkey

ABSTRACT

An 11 years old male Spaniel Cocker was handled to Animal Hospital with lethargy, polypnea and abdominal distension. At physical examination; abdominal sensitivity was detected. The body temperature and heart rate were measured in physiological levels. On ultrasonographic examination; hepatomegaly, thickened and enlarged gallbladder were detected. Hyperechoic content in the lumen was observed also mild free liquid was seen in the abdomen. Gall bladder wall thickness was measured as 3,5 mm. At biochemical examination; AST, ALP, GGT and total cholesterol levels were significantly increased and AST, glucose and phosphorus levels were slightly increased when compared with the reference values. Due to treatment, the patient died after a week and necropsy was performed. At the pathologic examination; cystic mucinous gallbladder was detected. In this case presentation, clinical, ultrasonographic and pathologic evaluation of cystic mucinous gallbladder in a dog was described.

Key Words: Cystic mucinous gallbladder, Dog, Ultrasonography

Bir Köpekte Kistik Müsinöz Safra Kesesinin Klinik, Ultrasonografik ve Patolojik Değerlendirilmesi

ÖZ

Bu olgunun materyalini, uyuşukluk, polipne ve abdominal distensiyon şikayetiyle hayvan hastanesine getirilen 11 yaşlı erkek bir Spaniel Cocker oluşturdu. Fiziksel muayenede; karında hassasiyet tespit edildi. Vücut ısısı ve nabız sayısı fizyolojik seviyelerde ölçüldü. Ultrasonografik muayenede; hepatomegali, kalınlaşmış ve genişlemiş safra kesesi tespit edildi. Safra kesesi lümeninde hiperekoik içerik, ayrıca batında az miktarda serbest sıvı görüldü. Safra kesesi duvar kalınlığı 3,5 mm olarak ölçüldü. Biyokimyasal incelemede; AST, ALP, GGT ve toplam kolesterol seviyeleri referans değerlere kıyasla önemli ölçüde artmış olarak tespit edildi. AST, glikoz ve fosfor seviyeleri ise referans değerlerin biraz üzerindeydi. Yapılan sağaltıma karşın hasta bir hafta sonra öldü ve nekropsi uygulandı. Patolojik muayenede, kistik müsinöz karakterde safra kesesi belirlendi. Bu olgu sunumunda bir köpekte rastlanılan kistik müsinöz safra kesesinin klinik, ultrasonografik ve patolojik değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kistik müsinöz safra kesesi, Köpek, Ultrasonografi.

To cite this article: Kabu M, Bozkurt M, F. Başer D, F. Cingı C. Ç. Clinical, Ultrasonographic and Pathologic Evaluation of Cystic Mucinous Gallbladder in a Dog. Kocatepe Vet J. (2021) 14(1):170-176

Submission: 20.01.2021 Accepted: 26.02.2021 Published Online: 28.02.2021

ORCID ID; MK: 0000-0003-0554-7278, MFB: 0000-0002-1669-0988, DFB: 0000-0003-4272-9011, CÇC: 0000-0001-6286-6553

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

INTRODUCTION

Cystic hyperplasia of the gallbladder is excessive enlargement of various sized cystic structures within the thickened hyperplastic mucosa of gallbladder. Most of the cysts substances are abundant amount of mucus (Cullen 2007, Stark et al. 2010). Characteristic appearance of hyperplastic mucosa impart that the various 1 to 3 mm cysts are being exist (Cullen 2007). Cystic mucinous hyperplasia in dogs is an idiopathic tumour-like lesion of the gallbladder, can cause gallbladder mucocele and entire mucosa may be affected (Cullen 2007, Secchi et al. 2012). The cause is not known (Cullen 2007). Mild cystic mucinous hyperplasia which the wall thickness of the gallbladder is 2-3 mm without inflammation and non-papillary mucosa is not cause mucocele. Intermediate hyperplasia, that thickness of the wall of the gallbladder is approximately 5-6 mm without inflammation, and was non-papillary mucosa can cause mucocele. Excessive cystic mucinous hyperplasia that the thickness of the wall of the gallbladder is approximately 10 mm with cholecystitis, the surface of mucosa is papillary, and the lesion caused mucocele (Secchi et al. 2012).

During abdominal ultrasonography, biliary ingredients especially sludge is frequently detected in gallbladder (Brömel et al. 1998, Bandyopadhyay et al. 2007). The structure of the biliary sludge was described as mucin, cell debris, glycoproteins, proteins, and precipitated crystals (Ko et al. 1999, Jüngst et al. 2006). Sludge appears as low-level echoes without acoustic shading (Jüngst et al. 2006) and gravitational motility (Besso et al. 2000). In dogs, formation for improvement the role of diet is not known however due to low cholesterol and free calcium contents in dog bile can limit the gall stone formation (Radlinsky 2013).

The aim of the case report was emphasized to determine the clinical, ultrasonographic and pathologic evaluation of cystic mucinous gallbladder in a dog.

CASE HISTORY

An 11 years old male Spaniel Cocker was handled to Animal Hospital with lethargy, polypnea and abdominal distension. At the anamnesis; as being informed that the case was handled to another clinic with the same symptoms and although the supportive treatment was applied for a week, but despite the supportive therapy the case became worsen. At the physical examination; abdominal sensitivity was detected, nevertheless body temperature and heart beat were measured in normal ranges. On ultrasonographic examination, hepatomegaly, thickened and enlarged gallbladder were detected. Hyperechoic content in the lumen was observed concurrently (Figure 1). And also mild free liquid was seen in the abdomen. Gall bladder wall thickness was

measured as 3,5 mm. At the whole blood count examination (Mindray Bc 2800) (Table 1); all parameters were been detected normally. At the biochemical examination (Roche Cobas C111) (Table 2); AST, ALP, GGT and total cholesterol levels were significantly increased. AST, glucose and phosphorus levels were slightly increased when compare with reference values. On the other hand, other biochemical parameters among reference values. A prescription was arranged to patient which contains ursodeoxycholic acid, amoxicillin clavulanic acid, enrofloxacin, nifuroxazide and hepatic diet. Due to treatment the patient died after a week and necropsy was performed.

During necropsy, on macroscopic examination; liver volume was increased and all the lobes surfaces were observed rough and dark brown-black colored. When lumen was opened, gallbladder's wall thickened, in lumen bright blackish colored, intensive consistency sludge was detected. This intergradient cumulated through the bile duct. Entire intestine parts was fuelled with hemorrhagic content and organ walls were thickened. Approximately 300 ml liquid was exist in the abdomen. Lung lobes were collapsed and heart was enlarged almost filled the thorax. Approximately 50 ml fluid was observed within the pericardial sac concurrently.

For microscopic examination, tissues were fixated in neutral buffered formaldehyde solution and they were embedded in paraffin. Paraffin blocks of gallbladder and duct of bladder were cut at 5 micrometer and mounted on slides. And then stained with Hematoxyline and eosin (HE) and Periodic acid Schiff (PAS). Also tissues are taken to adhesive slides for immunohistochemical analysis from paraffin blocks. After deparaffinization and hydration, a commercial streptavidin-biotin-peroxidase complex (Standard VECTASTAIN Elite ABC Kit, PK-6200, Vector Laboratories Inc, CA, USA) was used. All sections were preincubated in 1% non-immune serum at room temperature for 15 minutes to block nonspecific binding of second-step antibody. Further, tissue sections were incubated with MUC5AC (Lsbio, mouse, clone 1-13M1, 1/100 dilution) Cytokeratin (Thermo, mouse, ab1, 1/100) and ki-67 (Thermo, rabbit, sp6, 1/100 dilution) primary antibodies for 1 hour and then rinsed with PBS with a pH of 7.4 at room temperature. The sections were allowed to react according to the ABC kit procedure at room temperature. After that they were incubated with 3-amino-9-ethyl carbazole (ImmPACT AMEC Red Peroxidase Substrate, SK-4285, Vector Laboratories Inc, CA, USA) for 15 minutes and then counterstained with Gill's (III) hematoxylin solution. Gallbladder and bile duct lumens were observed that greenish brown in colour and filled with bile. These organs lamina propriae filled with mucinous fluid and bases of them are fitted with thinned prismatic epithelium occasionally and also coated with enlargements into the lumen and

heterogen sized crystals were exist. At immuno-histochemical evaluation it was observed that luminal structures were stained with mucin antibody and cyst

cells were occasionally stained with sitokeratin positively and with ki-67 negatively.



Figure 1. Ultrasonography appearance of hyperechoic sludge in the lumen.



Figure 2: Macroscopic appearance of gallbladder fuelled with sludge.

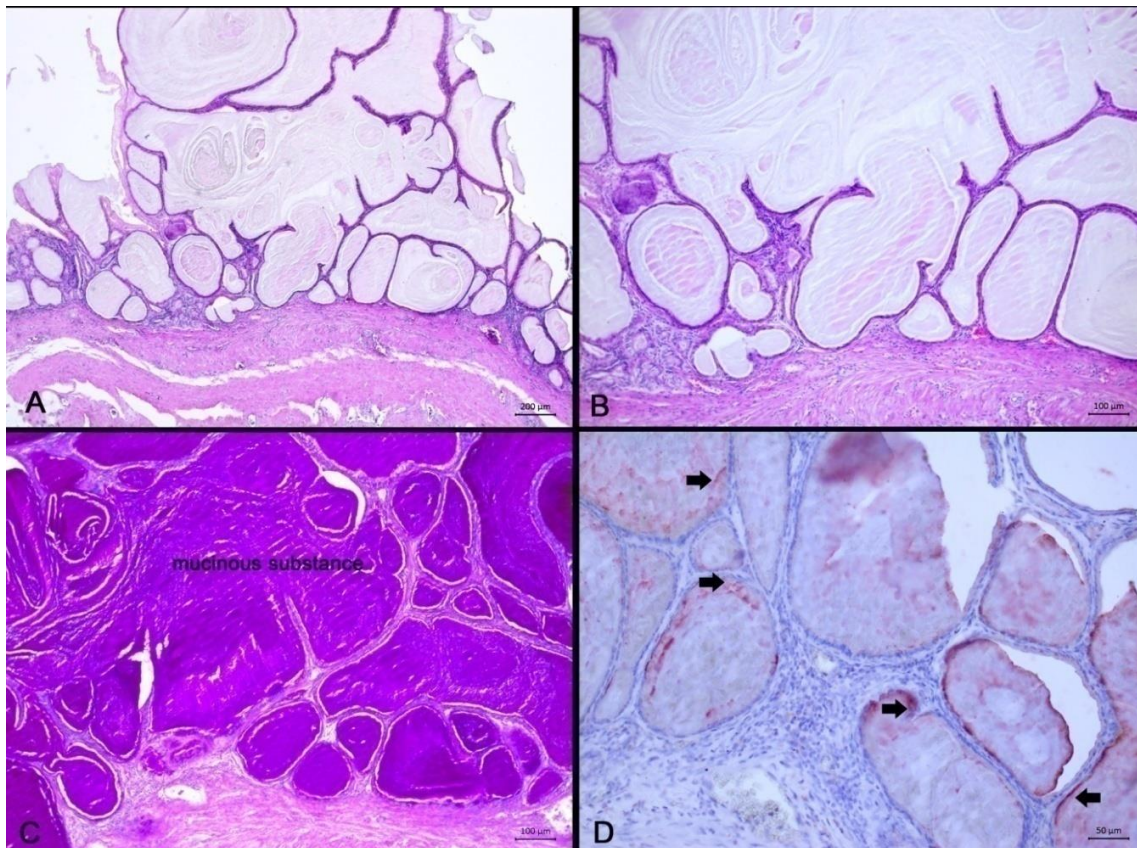


Figure 3: Microscopic appearance of cystic mucinous gallbladder. A-B: low and high power view of the lesion, HE. C: mucinous substance in the cyst lumen, PAS. D: MUC5AC positive mucinous substance (arrows), ABC method.

Table 1: Haematologic parameters

Parameter	Value	Normal Range (Tvedten 1994)	Unit
WBC	14.5	6.02-16.02	$10^3/\mu\text{L}$
Lymphocyte	2.5	0.53-3.44	$10^3/\mu\text{L}$
Monocyte	0.5	0-0.43	$10^3/\mu\text{L}$
Granulocyte	11.5	3.23-10.85	$10^3/\mu\text{L}$
RBC	5.38	6.15-8.70	$10^6/\mu\text{L}$
HGB	12.1	14.1-20	g/dL
HCT	43.8	43.3-59.3	%
MCV	81.5	63-77.1	FL
MCH	22.4	21.1-24.8	Pg
MCHC	27.6	29.9-35.6	g/dL
RDW	17.1	11.9-14.9	%
PLT	718	166-575	$10^3/\mu\text{L}$
MPV	7.8	3.9-6.1	FL

Table 2: Serum biochemical parameters

Parameter	Value	Normal Renge (Tvedten 1994)	Unit
ALT	375	10-94	U/L
AST	62	10-62	U/L
ALP	934	0-90	U/L
Urea	54,5	14.98-68.48	mg/dL
Total Bilirubin	0,4	0.1-0.6	mg/dL
Direct Bilirubin	0,12	-	mg/dL
Ca	9,1	9-11.9	mg/dL
P	6,52	1.9-7.9	mg/dL
TP	5,91	5.3-7.6	g/dL
Albumin	3,01	3.2-4.7	g/dL
Creatinin Kinase	100,4	51-529	U/L
LDH	58,1	42-130	U/L
Glucose	130	53-117	mg/dL
GGT	152	1-6	U/l
Total Triglyceride	48,29	10-500	mg/dL
Total Cholesterol	443,74	116-317	mg/dL

DISCUSSION

ALP production is markedly increase while bile retention (Watson 2010). For cholestasis marker, ALP levels are higher in affected dogs despite no important difference when compare with the other tissues (Hoffmann and Solter 2008). Although ALP levels can elevate with the use of dogs such as some drugs (Gonzalez and Silva 2006). There were no evidences of usage of these drugs in the dog. In this study, it was suggested that ALP elevations exist due to formation of biliary sludge.

In a study which was performed in 18 healthy dogs after cystic duct ligation; black and viscous material microscopically identical to sludge was observed in 72 hours (Bernhoft et al. 1983), although high frequency of thickened bile without proof of hepatobiliary disorders and can be detected by USG and serum biochemistry (Brömel et al. 1998). Normally during abdominal examination biliary sludge can be detected hyperechogenic in ultrasonographic examination and usually acoustic shadowing cannot be seen and position of the gallbladder content is not changed to gravity and dog's lying position (Brömel et al. 1998, Besso et al. 2000, Pazzi et al. 2003, Uno et al. 2009). While cholecystitis, thickening of gallbladder wall generally increase (Nyland and Mattoon 2002). 24 symptomatic and 19 asymptomatic gallbladder mucocele patients were evaluated in a study and in four dogs wall thickness were determined over 3 mm. (Choi et al. 2014). In the present case, gallbladder wall thickness was measured 3,5 mm, hyperechoic and stable lumen content was seen concurrently. Also

cystic mucinous hyperplasia was confirmed with histopathology findings as well. It was thought that aforementioned patient who has cystic mucinous hyperplasia reflects gallbladder mucocele and wall thickness under 5-6 mm and lumen appearance is a good indicator for evaluating the condition of gallbladder.

Clinical, ultrasonographic and pathologic evaluation of cystic mucinous gallbladder in a dog was described and high serum ALP and GGT levels should be considered for getting suspicious about gallbladder diseases.

Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Ethical Approval: This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with 8 (k) of the "Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees".

REFERENCES

- Bandyopadhyay S, Varshney JP, Hoque M, Sarkar M, Ghosh MK. Prevalence of cholecytic diseases in dogs: an ultrasonographic evaluation. *Asian J Anim Vet Adv* 2007; 2 (4): 234-238.
- Bernhoft RA, Pellegrini CA, Broderick WC, Way LW. Pigment sludge and stone formation in the acutely ligated dog gallbladder. *Gastroenterology*, 1983; 85: 1166-71.
- Besso JG, Wrigley RH, Gliatto JM, Wenster CR. Ultrasonographic appearance and clinical findings in 14

- dogs with gallbladder mucocele. *Vet Radiol Ultrasoun.* 2000; 41 (3): 261–71.
- Brömel C, Barthez PY, Léveillé R, Scrivani PV.** Prevalence of gallbladder sludge in dogs as assessed by ultrasonography. *Vet Radiol Ultrasoun* 1998; 39 (3): 206–10.
- Choi J, Kim A, Keh S, Oh J, Kim H, Yoon J.** Comparison between ultrasonographic and clinical findings in 43 dogs with gallbladder mucoceles. *Vet Radiol Ultrasound* 2014; 55(2): 202–7.
- Cullen JM.** Liver, biliary system and exocrine pancreas. In: McGavin Z, eds: *Pathologic basis of veterinary disease.* 4th ed., Mosby Elsevier, Missouri USA, 2007; pp. 393-461.
- González FD, Silva SC.** Perfil bioquímico sanguíneo. In: *Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária*, 2th ed, Editora Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006; pp. 313-359.
- Hoffmann WE, Solter PF.** Diagnostic enzymology of domestic animals. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds: *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 6th ed. Academic Press, San Diego, 2008; pp. 351-378.
- Jüngst C, Ublick GAK, Jüngst D.** Microlithiasis and sludge. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006; 20 (6): 1053–62.
- Ko CW, Sekijima JH, Lee SP.** Biliary sludge. *Ann Intern Med.* 1999; 130 (4): 301–11.
- Nyland TG, Mattoon JS.** *Veterinary diagnostic ultrasonography.* WB Saunders Company, Philadelphia, USA, 2002.
- Pazzi P, Gamberini S, Buldrini P, Gullini S.** Biliary sludge: the sluggish gallbladder. *Dig Liver Dis.* 2003; 35(3): 39–45.
- Radlinsky MG.** Surgery of the extrahepatic biliary system. In: Fossum TW, ed: *Small animal surgery* 4th ed. Elsevier, Canada, 2013; pp. 618-633.
- Secchi P, Pöppel AG, Ilha A, Filho HCK, Lima FES, Garcia AB, González FHD.** Prevalence, risk factors, and biochemical markers in dogs with ultrasound-diagnosed biliary sludge. *Res Vet Sci.* 2012; 93, 1185–1189.
- Stark R, Gazsi N, Nagy CF, Jakab C.** Cystic mucinous hyperplasia of gallbladder in dogs. *Hungar Vet J* 2010; 132 (3): 176-85.
- Tvedten H.** Appendix II. In: Willard MD, Tvedten H, Turnwald GH, eds: *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 2nd ed. WB Saunders Company, USA, 1994; pp. 359-361.
- Uno T, Okamoto K, Onaka T, Fujita K, Yamamura H, Sakai T.** Correlation between ultrasonographic imaging of the gallbladder and gallbladder content in eleven cholecystectomised dogs and their prognoses. *J Vet Med Sci* 2009; 71: 1295–1300.
- Watson PJ, Bunch SE.** Testes diagnósticos para o sistema hepatobiliar. In: Nelson RW, Couto CG, Eds: *Medicina Interna de Pequenos Animais*, 4th ed. Elsevier, Rio de Janeiro, 2010; pp. 496–512.

Instruction for Authors

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

References

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

Journal:

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

Book section:

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

Web page:

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

Thesis:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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