



Official Publication of  
The Afyon Kocatepe University  
Faculty of Veterinary Medicine

# K o c a t e p e Veterinary Journal

2021, 14 (3) September



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

**Section Editors**

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

**Foreign Language Editor**

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

**Statistics Editors**

Prof. Dr. İbrahim KILIÇ  
Assoc. Prof. Dr. İlkyay 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

Adnan Menderes University-Turkey

Afyon Kocatepe 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://www.kvj.aku.edu.tr)

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

**\*Only accepts online submission\***

### The Reviewer List (in alphabetical order)

Ali ÇALIK

Ali KUMANDAŞ

Ayhan FİLAZİ

Başak BOZTOK ÖZGERMEN

Bülent EKİZ

Büşra AKTAŞ MANSUROĞLU

Çağrı Çağlar SİNMEZ

Erdoğan UZLU

Evren ESİN

Fulya BENZER

İbrahim DEMİRKAN

İlkay DOĞAN

İsmail KÜÇÜKKURT

Koray ÇELİKELOĞLU

Miyase ÇINAR

Muhammed Fatih DOĞAN

Murat Sırrı AKOSMAN

Murat TANDOĞAN

Murat YILDIRIM

Mustafa TEKERLİ

Osman KARABULUT

Ömür KOÇAK

Özgül KÜÇÜKASLAN

Özgür KAYNAR

Özlem SARAL

Pınar SAÇAKLI

Sedat SEVİN

Semiha DEDE

Yasin DEMİRASLAN

Yusuf Sinan ŞİRİN

Ankara University

Kırıkkale University

Ankara University

Aksaray University

İstanbul University

Burdur Mehmet Akif Ersoy University

Erciyes University

Balıkesir University

Çukurova University

Munzur University

Afyon Kocatepe University

Gaziantep University

Afyon Kocatepe University

Afyon Kocatepe University

Kırıkkale University

Pamukkale University

Afyon Kocatepe University

Afyon Kocatepe University

Kırıkkale University

Afyon Kocatepe University

Aksaray University

İstanbul Üniversitesi

Dicle University

Atatürk University

Recep Tayyip Erdoğan University

Ankara University

Ankara University

Yüzüncü Yıl University

Burdur Mehmet Akif Ersoy University

Burdur Mehmet Akif Ersoy University

**RESEARCH ARTICLES**

- Effect of the Technical and Visual Devices Used in the Laboratory on Student Performance**  
(*Laboratuarda Kullanılan Teknik ve Görüntüli Cihazların Kullanımının Öğrenci Performansı Üzerine Etkisi*)  
**Selahattin KONAK, Hasan Huseyin DEMİREL, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, İbrahim DURMUŞ** 284-292
- Arterial Vascularization and the Macroanatomic and Histological Structures of the Testis, Penis, and Prostate Gland in Red Foxes (*Vulpes vulpes*)**  
(*Kızıl Tilkielerde (*Vulpes vulpes*) Testis, Penis ve Prostat'ın Arteriyel Vaskülarizasyonu, Makroanatomik ve Histolojik Yapısı*)  
**Gülseren KIRBAŞ DOĞAN, Semine DALGA, Yalçın AKBULUT, Kadir ASLAN, Hasan ASKER, Ebru KARADAĞ SARI** 293-302
- In Silico Analysis of Resistance Gene Identifiers on Plasmids of blaNDM-5 Producing Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated in Humans and Animals**  
(*İnsanlardan ve Hayvanlardan İzole Edilen blaNDM-5 Üreten Karbapenem Dirençli Escherichia coli Kökenlerinin Plazmidleri Üstünde Bulunan Direnç Gen Tanımlayıcılarının İn Silico Analizi*)  
**Mehmet Demirci, Akin Yigin, Seda Ekici** 303-308
- An *In Vitro* Evaluation of the Silage Mixtures Containing Different Levels of White Mulberry Pomace and Meadow Grass** (*Farklı Düzeylerde Beyaz Dut Posası ve Çayır Otu İçeren Silaj Karışımlarının In Vitro Değerlendirilmesi*)  
**Yeliz KÖKSAL, Bora BÖLÜKBAŞ, Zehra SELÇUK** 309-315
- Pigeon in Konya Province Folklore: 2. Breeding** (*Konya İli Folklorunda Güvercin: 2. Yetiştiricilik*)  
**Esra ÇELİK, Aşkın YAŞAR, Emine Merve DANIŞ** 316-324
- Investigation of the Effect of Zingerone on Some Biochemical Parameters on Cisplatin-Induced Liver Toxicity in Rats** (*Sisplatin ile Karaciğer Toksisitesi Geliştirilen Ratlarda Zingeron'un Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması*)  
**Amdia MAHAMADU, Fatih Mehmet KANDEMİR** 325-338
- The Effect of Orally High Dose Vitamin C Supplementation on Serum Vitamin C, Leptin and Cortisol Parameters in Rats** (*Sıçanlarda Oral Yüksek Doz Vitamin C Takviyesinin Serum Vitamin C, Leptin ve Kortizol Parametrelerine Etkisi*)  
**Mehmet BAŞEGMEZ, Abdullah ERYAVUZ** 339-345
- Bupropion Improves Biochemical Parameters of Ethanol Exposure in Rats**  
(*Bupropion Etanole Maruz Kalan Ratlarda Biyokimyasal Parametreleri İyileştirir*)  
**Ali TÜREYEN** 346-350
- Effect of Cold Stress on Milk Yield, Milk Composition and Some Behavioral Patterns of Simmental Cows Kept in Open Shed Barns** (*Açık Barınaklarda Yetiştirilen Simmental İneklerinde Soğuk Stresinin Süt Verimi, Süt Bileşimi ve Bazı Davranış Özelliklerine Etkisi*)  
**Emrah KAYGUSUZ, Filiz AKDAĞ** 351-358
- Investigation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Bee Pollen Collected from Different Geographical Regions in Turkey** (*Türkiye'nin Farklı Coğrafi Bölgelerinden Toplanan Arı Poleninin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması*)  
**Paria TABATABAEI, Cevat NISBET** 359-365
- Comparison of The Efficiency of Ethacridine Lactate and Hypochlorous Acid During the Early Period of Wound Healing in Rats** (*Ratlarda Erken Dönem Yara İyileşmesinde Etakridin Laktat ve Hipokloröz Asit Etkinliğinin Karşılaştırılması*)  
**Yahia ALHBOU, Birkan KARSLI, Tuğçe SÜMER** 366-375

**CASE REPORT**

- The Treatment of Tracheal Rupture and Generalized Subcutaneous Emphysema in A Dog**  
(*Bir Köpekte Trachea Rupturu ve Generalize Subkutan Amfizemin Tedavisi*)  
**Fatma GÖRÜCÜ, İbrahim DEMİRKAN** 376-381

## Effect of the Technical and Visual Devices Used in the Laboratory on Student Performance

Selahattin KONAK<sup>1</sup>, Hasan Huseyin DEMİREL<sup>2\*</sup>, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ<sup>3</sup>, İbrahim DURMUŞ<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Bayat Vocational School, Department of Laboratory and Veterinary Health, 03780 Afyonkarabısar, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Bayat Vocational School, Department of Laboratory and Veterinary Health, 03780 Afyonkarabısar, Turkey

<sup>3</sup>Afyonkarabısar Health Sciences University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, 03800, Afyonkarabısar, Turkey

<sup>4</sup>Afyon Kocatepe University, Şubut Vocational School, Department of Laboratory and Veterinary Health, 03830 Afyonkarabısar, Turkey

### ABSTRACT

The use of modern microscopes and alternative training tools for computer-aided imaging systems in laboratory education has become widespread today. In this study, the microscope, also used in scientific studies, is also regarded as a tool that facilitates learning in applied lessons from the first years in colleges. From this point of view, the research problem was determined "as the effect of using technical and visual devices used in the laboratory on student performance." While the population of the study is composed of the students studying at the Department of Laborant and Veterinary Health Program at Afyon Kocatepe University Bayat Vocational School, the sample consists of a total of 125 first and second-grade students studying at the same university and department in the 2019-2020 academic year. In the study, a survey model was used to reveal the students' knowledge of microscope usage. The "microscope usage knowledge scale" developed by the researchers, which consists of technical information and terms, was applied to the sample group. As a result, it was observed that 72.8% of the students thought that the training provided through the microscope with the trinocular head was better and more effective.

**Key words:** Laboratory and Veterinary Health education, laboratory practices, microscope usage information

\*\*\*

### Laboratuvarda Kullanılan Teknik ve Görüntülü Cihazların Kullanımının Öğrenci Performansı Üzerine Etkisi

#### ÖZ

Laboratuvar eğitiminde bilgisayar destekli görüntüleme sistemine ait modern mikroskoplar ve alternatif eğitim araçlarının kullanımı da günümüzde yaygın hale gelmiştir. Bu çalışmada bilimsel çalışmalarda da kullanılan mikroskop aynı zamanda yüksekokullarda ilk yıllardan itibaren de uygulama derslerinde öğrenmeyi kolaylaştıran bir araç olarak görülmektedir. Buradan hareketle çalışmanın ana fikir cümlesi "laboratuvarda kullanılan teknik ve görüntülü cihazların kullanımının öğrenci performansı üzerine etkisi" olarak belirlenmiştir. Çalışmanın evrenini Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık bölümünde öğrenim gören öğrenciler oluştururken, örneklemini 2019-2020 eğitim-öğretim senesinde aynı üniversite ve bölümden seçilen 1 ve 2. sınıfta öğrenim gören toplam 125 veteriner laborant öğrencisi oluşturmaktadır. Çalışma öğrenci adaylarının mikroskop kullanım bilgilerini ortaya koyan tarama modelindedir. Araştırmacılar tarafından geliştirilen ve görüntünün incelenmesi, teknik bilgi ve terimlerden oluşan "mikroskop kullanım bilgisi ölçeği" örneklem grubuna uygulanmıştır. Sonuç olarak öğrencilerin % 72.8'i trinokuler başlığa sahip mikroskopta verilen eğitimin daha iyi ve etkili olduğunu düşündüklerini göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Laborant ve Veteriner Sağlık eğitimi, laboratuvar uygulamaları, mikroskop kullanım bilgisi.

To cite this article: Konak S, Demirel H.H, Erdoğmuş S.F, Durmuş İ. Effect of the Technical and Visual Devices Used in the Laboratory on Student Performance. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3):284-292.

Submission: 25.04.2021 Accepted: 17.06.2021 Published Online: 16.08.2021

ORCID ID: SK: 0000-0003-2551-7017, HHID: 0000-0002-4795-2266, SFH: 0000-0002-4319-7558, İD: 0000-0003-1360-8843

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

## GİRİŞ

Günümüzde bilim; hayatımızın ayrılmaz bir unsuru haline gelmiştir. Bu sebeple günümüzün demokratik toplumları bilimi ve onun katkılarını takdir eden, bilimin ortaya koyduğu temel fikirler hakkındaki yeterli tecrübeye sahip ve en önemlisi, bilimin ortaya çıkardığı bilgi birikimlerini eleştirel yaklaşılabilen bireylere ihtiyaç vardır (Anonim, 2018) Bireylerin ve toplumların gelişmesini sağlayan en etkin ve temel vasıta eğitimidir. Bireylerin büyüme ve ilerlemelere yön vermeleri, yaşamlarında karşılaştıkları sorunlara çözüm bulmaları ve bütün gereksinimlerini karşılayıp çevreleri ile iyi bir ilişki kurabilmeleri sistemli ve ilmi etkinliklerle dolu bir eğitimle gerçekleşir (Çakal, 1994). Yeni dönemde eğitimde yetenek düzeyinin yükselmesi, bireyin kendini yetiştirmesi, geliştirmesi ve bireysel kabiliyetlerini sonuna kadar kullanması şeklinde yeterliklerinin ön plana çıkacağını belirten Numanoğlu (1999)'na göre, kişinin bilgi odaklı bir hayatı öğrenme, analitik düşünme, sentez yapabilme, sorunları çözme ve etkin iletişim kurma becerilerine sahip olması da beklenir. Işık mikroskopları genel laboratuvar çalışmalarında en fazla kullanılan aletlerden birisidir. Çünkü biyolojik materyallerin birçoğu insan gözünün görme sınırı altında olduğu için laboratuvardaki deneylerin birçoğu da sadece mikroskop sayesinde gerçekleştirilebilmektedir (Dikmenli ve ark., 2002). Laboratuvar uygulamaları, daha çok duyu organına hitap eder ve dersin etkin olabilmesi için her türlü araç gereci barındırır. Öğrencilere araştırma, inceleme, beceri ve alışkanlıklarını kazandırır, izleme kabiliyetini geliştirir (Eschenhagen ve ark., 1998). Öğrenciler, bilimsel yöntemi kullanarak soru sorma, inceleme yapma, problem tayini, gözlem, hipotez kurma, çeşitli laboratuvar gereçlerini kuralına uygun kullanma, veriler toplayıp bunları analiz etme ve neticelerle genellemelere yetiştirme gibi beceriler kazanırlar. Bu amaçlara ulaşmak için yapılan faaliyetlerin tümüne laboratuvar çalışması denir. Laboratuvar ortamında öğrenciler, ilk elden somut deneyimler kazanır ve yaparak yaşayarak öğrenmeye dayalı etkinliklerle biyoloji alanındaki bilgilerini pekiştirerek kendileri için daha anlamlı hale getirirler (Adey ve ark., 1995). Laboratuvar, öğrencilerin yeteneklerini geliştirmelerine fırsat sağlayan bir öğrenme ve öğretme ortamıdır. Laboratuvar olmadan, öğrencilerin anlamada zorluk çekebilecekleri biyoloji kavramlarını somutlaştırmaları ve kavramaları kolay değildir. Ancak öğrenci birebir öğrenme faaliyetlerine katıldığında bilgilerin kavranması ve kalıcılığının sağlanması daha basit olabilmektedir. Bu fırsatlar sadece laboratuvarda sağlanabilmektedir (Ekici, 2009). Laboratuvar etkinlikleri, ilmi konuların anlaşılabilmesinde öğrencilere destek verir. Çünkü laboratuvar dersleri sayesinde öğrenciler soyut kavramları somutlaştırarak daha iyi anlayarak öğrenebilirler. Mikroskop, en genel tanımıyla, gözle görülemeyecek kadar küçük objelerin büyütülmüş ve net görüntülerini elde etmeye yarayan

ve mercek sistemlerinden ibaret olan optik bir alettir. Mikroskop kullanımı hakkında ne kadar fazlaca bilgi edinilir ve laboratuvar derslerinde ne kadar fazla yararlanılırsa, öğretim aşamalarının da o kadar başarılı olacağı söylenebilir. Laboratuvar zaman geçirme, öğrencilerin keşfetme duygusunu tatmalarında ve psikomotor becerilerinin de gelişmesinde etkilidir (Dökme ve ark., 2010). Laboratuvar atmosferi, ortamdaki asit ve bazların kokusu, çeşitli gözlem aletleri veya birtakım laboratuvarlardaki bitki, hayvan numune ve maketlerinin öğrencileri motive edebileceği, yaratıcılık ve keşfetme yeteneklerini kamçılacağı dikkate alınmalıdır (Bayraktar ve ark., 2006). Bu çalışmada öğrencilerin genel öz yeterlik algıları ve mikroskop kullanımına yönelik öz yeterlik inançları belirlenmeye çalışılmıştır. Öğrencilerin mikroskop kullanımına yönelik öz yeterlik inançlarının olumlu yönde artırılması, onlarda merak ve keşfetme arzusu uyandıracak; bu da onları, araştırmaya, sorgulamaya, öğrenmeye yöneltecek, kavram yanlışlarını düzeltecek, laboratuvar derslerine karşı olumlu tutum geliştirmelerine yardımcı olacaktır.

## MATERYAL ve METOT

Bu araştırma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık bölümünde öğrenim gören, üniversite öğrencilerinin laboratuvar derslerinde; teorik olarak okutulan birtakım ders konularının uygulama aşamasında görüntülü ışık mikroskopunun öğrenci üstündeki öğrenme performansı amaçlanmıştır. Bu amaçla 1. ve 2. sınıf öğrencilerinden oluşan 125 kişi üzerinde çalışılmıştır. Bu çalışma ile alakalı Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etik Kurulu yönetmeliği ilkelerine uyularak 29.11.2019 tarih ve 11 sayılı 2019-39 karar onayı ile gerçekleştirildi. Bu uygulamalarda daha önceki çalışmalarda süt numunelerinden izole edilmiş saha izolatlarının gram boyaması ile beyin dokusundan izole edilen *Listeria* bakterisine yönelik hematoksilen eozin doku boyama yöntemi kullanılmış olup, pozitif kontrol grubu olarak *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) suşları kullanıldı. Yapılan boyama işlemlerinin ışık mikroskobu ile görüntüleme sistemi ve yazılımına sahip trinoküler başlığa sahip inceleme mikroskobu ile binoküler mikroskoptaki görüntünün öğrencinin öğrenme yetisine olan etkisi karşılaştırılmıştır. Anket formunda mikroskop kullanımına ilişkin sorular (n=125) öğrencilere sunularak gerçekleştirildi. Araştırmanın evrenini Afyon Kocatepe Üniversitesi Bayat Meslek Yüksekokulu Laborant ve Veteriner Sağlık bölümünde 2019-2020 Eğitim Öğretim yılı Bahar döneminde öğrenim gören üniversite öğrencileri oluşturmaktadır. Araştırmada evrene ulaşmak hedeflendiğinden, örneklem seçimi yapılmamıştır. Yaşları 18-25 arasında değişen 62 kız, 63 erkek olan



125 üniversite öğrencisi bu altyapı projesinin çalışma grubunu oluşturmuşlardır.

### Ölçme Aracının Geliştirilmesi

Araştırma verilerinin toplanmasında öğrencilerin demografik özelliklerini belirlemek amacıyla geliştirilen “öğrenci tanıtıcı özellikler formu” ve araştırmacılar tarafından öğrencilerin eğitimlerine yönelik olarak kullanılan binoküler ışık mikroskobu ile trinoküler ışık mikroskobu arasındaki kullanım becerilerine ilişkin görüşlerini belirlemek amacıyla geliştirilmiş “mikroskop kullanım bilgisi değerlendirme formu” düzenlenerek kullanılmıştır. Mikroskop çalışması değerlendirme formu’nda 30 ölçüt açısından değerlendirmelerine olanak sağlayacak şekilde

hazırlanmıştır (Tablo 6). Ölçekte öğrencilere, sorulan sorulara “Kesinlikle Katılmıyorum”, “Katılmıyorum”, “Kararsızım”, “Katılıyorum”, “Kesinlikle Katılıyorum” biçimindeki beş görüş seçeneği sunuldu ve öğrencilerden bu görüşler arasında en uygun olanını seçmeleri istendi.

Ölçeğin geçerliliğini belirlemede yapı geçerliliği aracına yer verildi ve bu suretle faktör analizi yapıldı. Tablo 2’de Bartlett testi verilerine nazaran faktör analizinin yapılabirliği belirlenmiş ( $X^2= 1,833$ ;  $p<0.001$ ) ve hesaplanan Kaiser-Meyer-Olkin değeri (KMO = 0.718) örneklem hacminin yeterli oranda olduğunu göstermiştir.

**Tablo 1.** Faktör Analizinin Yapılabilirliği ve Örneklem Hacminin Yeterliliği

**Table 1.** Feasibility of Factor Analysis and Adequacy of Sample Size

<b>KMO ve Bartlett Testi</b>		
Kaiser-Meyer-Olkin Değeri		0.718
Bartlett Testi	Ki-Kare ( $X^2$ )	1.833
	Serbestlik Derecesi (Sd)	561
	Anlamlılık Düzeyi (p)	0.000

X<sup>2</sup>: Ki-Kare Değeri Sd: Serbestlik Derecesi p: Anlamlılık Düzeyi

### İstatistiksel Analizler

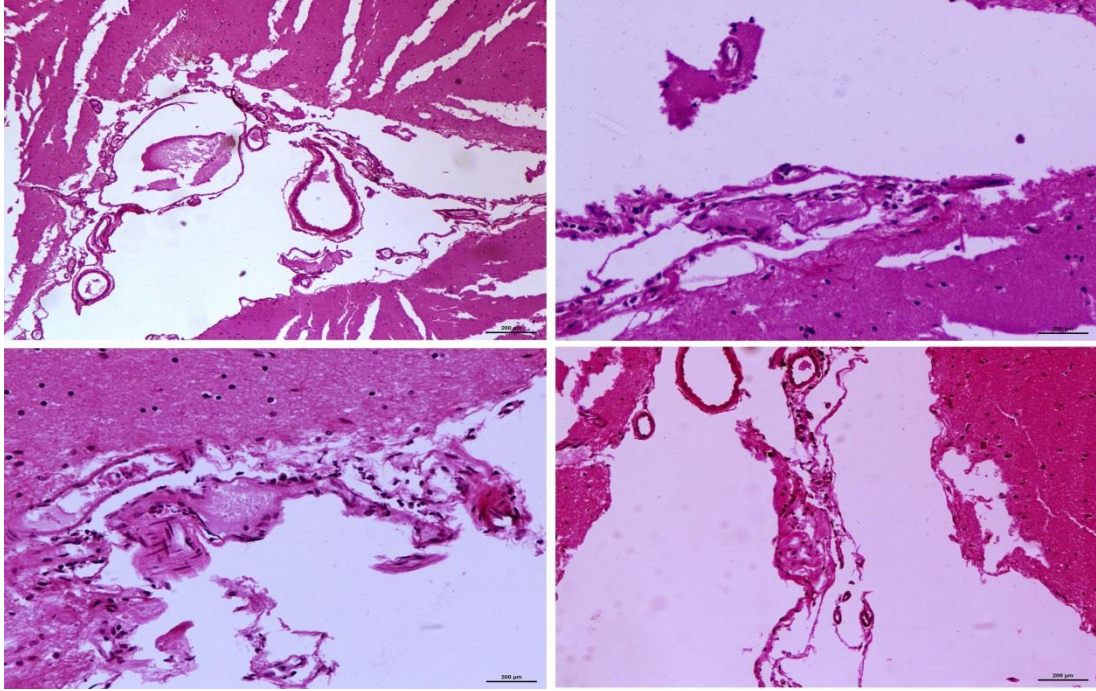
Ölçme aracı, bölümde bulunan binoküler ışık mikroskobu ve bu proje kapsamında temin edilmiş trinoküler ışık mikroskobu ile öğrenimlerine devam eden 125 tane öğrenciye uygulandı. 2019-2020 Eğitim/Öğretim senesinde öğrenim görmüş gönüllü olan 1.sınıf ve 2.sınıf 125 öğrenci olup, bunlardan

62’ini kız 63’ünü erkek öğrenciler oluşturmaktadır. Ölçme aracı öğrencilere ders sonunda verilerek cevaplamaları sağlandı. Öğrencilerden elde edilen veriler bilgisayar paket programı SPSS 16.0 (Statistical Package for Social Sciences) kullanılarak veriler elde edildi.

## BULGULAR



**Şekil 1:** Trinokuler ve binokuler ışık mikroskobu ile yürütülen uygulama dersleri  
**Figure 1:** Practice lessons conducted with trinocular and binocular light microscopy



**Şekil 2:** Beyin dokusuna ait hematoksilen eozin boyasına ait görüntüler. (Orijinal büyütme 10x ve ölçek çubukları 200 mm'yi temsil ediyor.)  
**Figure 2:** Images of hematoxylin eosin dye of brain tissue. (The original magnification represents 10x and the scale bars represent 200mm.)



Katılımcıların demografik özelliklerinin belirlenmesi ve karşılaştırılmasına yönelik frekans ve yüzde hesaplamaları yapılmış ve tablolar halinde ayrı ayrı sunulmuştur. Araştırmanın örneklem grubunu oluşturan 125 katılımcı en önce cinsiyetleri açısından karşılaştırılmış ve sonuçları Tablo 2’de ayrıntılı olarak gösterilmiştir. Buna göre katılımcıların %49.4 kadın, %50.6’sinin ise erkek öğrenci olduğu görülmektedir.

**Tablo 2.** Katılımcıların cinsiyete göre dağılımları  
**Table 2.** Distribution of the participants by gender

<b>Grup</b>	<b>Sayı (f)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
<b>Kadın</b>	62	49.6
<b>Erkek</b>	63	50.4
<b>Toplam</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

f: Sayı, %:Yüzde

Katılımcıların yaş dağılımlarına ilişkin ortalama değerleri Tablo 3’de ayrıntılı olarak yer almaktadır. Tablo 2’ye göre çalışma örneklemini 18-25 yaş arasındaki öğrencilerden oluşmaktadır.

**Tablo 3.** Katılımcıların yaşa göre dağılımları  
**Table 3.** Distribution of the participants by age

<b>Grup</b>	<b>Sayı (f)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
18-21	118	94.4
22-25	6	4.8
25 üstü	11	0.8
<b>Toplam</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

f: Sayı, %:Yüzde

Katılımcıların eğitim durumlarına yönelik frekans ve yüzde dağılımları Tablo 4’de incelendiğinde; araştırma dahilindeki öğrencilerin %97.6’sının ön lisans %2.4’ünün ise lisans programında olduğu tespit edilmiştir.

**Tablo 4.** Katılımcıların eğitim durumuna ilişkin dağılımları  
**Table 4.** Distribution of the participants by educational status

<b>Grup</b>	<b>Sayı (f)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
Ön Lisans	122	97.6
Lisans	3	2.4
<b>Toplam</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

f: Sayı, %:Yüzde

Katılımcıların sınıf dağılımlarına ilişkin yaklaşık ve yüzde değerleri Tablo 5’te ayrıntılı olarak yer almaktadır. Tablo 4’e nazaran %61.6 s 1.sınıf %38.4 ise 2. sınıf öğrencilerinden oluşmaktadır.

**Tablo 5.** Katılımcıların sınıf dağılımlarına ilişkin dağılımları  
**Table 5.** Distribution of the participants regarding the class

<b>Grup</b>	<b>Sayı (f)</b>	<b>Yüzde (%)</b>
1.Sınıf	77	61.6
2.Sınıf	48	38.4
<b>Toplam</b>	<b>125</b>	<b>100</b>

f: Sayı, %:Yüzde

Tablo 6'da anket sorularına cevap veren öğrencilerimizin "Öğrenme-Anlama" boyutuna ait değerlendirmelerinin aritmetik ortalamaları ve standart sapma değer ölçümleri yapılmıştır.

**Tablo 6.** Verilerin "Öğrenme-Anlama" Değerine İlişkin Belirleyici İstatistikler (n=125)

**Table 6.** Descriptive Statistics Regarding the "Learning-Comprehension" Value of the Data (n = 125)

No	Mikroskop Kullanım Bilgisi Değerlendirme Ölçütü İfadeler	$\bar{X}$	s.s
1.	Trinoküler mikroskop görüntüsü incelenerek yapılan uygulamada öğretim aşaması daha kolay gerçekleşmektedir.	4.68	0.64
2.	Trinoküler mikroskopta binokülere göre preparattaki görüntü sahasını bulmak daha kolaydır	4.624	0.54
3.	Trinoküler mikroskopta normal ve anormal olan doku,hücre,bakteri görüntüsünün ayrt edilmesi daha kolaydır.	4.616	0.82
4.	Trinoküler mikroskopta görüntüden sonuca ulaşmak daha kolaydır.	4.576	0.65
5.	Trinoküler mikroskop binoküler mikroskoba göre daha ilgi çekicidir.	4.352	0.97
6.	Trinoküler mikroskopta inceleyen öğrenci açısından öğrenme aşaması daha kolaydır.	4.632	0.61
7.	Trinoküler mikroskopta hüresel ayrıntıları fark etmek daha kolaydır.	4.664	0.69
8.	Trinoküler mikroskop kullanımında öğrencinin dikkatini incelenen sahaya odaklamak daha kolaydır.	4.56	0.61
9.	Trinoküler mikroskopta farklı boyama yöntemi kullanılarak yapılan boyama işlemlerinde hücreleri ya da incelenen diğer unsurları ayrt etmek daha kolaydır.	4.464	0.70
10.	Trinoküler mikroskopta hücrelerin çaplarını ve uzunluklarını ölçeklendirmek daha kolaydır.	4.232	0.85
11.	Mikroskop, uygulama derslerinin eğitim kalitesinin artmasına katkı sağlar.	4.808	0.60
12.	Bir şeyi yerinde bizzat izleyerek daha iyi anlarım.	4.596	0.77
13.	Bir derste eğitim araçları kullanılırsa konuyu daha kolay öğrenirim.	4.84	0.61
14.	Bir şeyi yaparak-yaşayarak daha iyi öğrenirim.	4.808	0.66
15.	Eğitim araçlarının kullanılması öğrendiklerimizin kalıcı olmasını sağlamaz.	1.28	0.88
16.	Eğitim araçları sayesinde bir konuyu tam olarak öğrenirim.	4.464	0.98
17.	Derste kullanılan eğitim araçları öğrenmeyi kolaylaştırılmaz.	1.192	0.71
18.	Eğitim araçlarının kullanılması öğrenmeyi zevkli hale getirmez.	1.16	0.58
19.	Eğitim araçlarının kullanılması yaratıcılığı geliştirir.	4.6	0.70
20.	Eğitim araçlarının kullanılması mevcut bilgilerimizi artırır.	4.592	0.70
21.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz yeni bilgiler geliştirme ve üretme becerisini geliştirir.	4.68	0.64
22.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz, zamanı etkili kullanmamızı sağlar.	4.632	0.70
23.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz pratik olmamıza katkı sağlar.	4.768	0.55
24.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz başkaları ile işbirliği yapma alışkanlığı kazandırır.	4.432	0.65
25.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz özgür düşünmemizi sağlar.	4.088	0.97
26.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz takım çalışmalarına etkin olarak katılmamızı sağlar.	4.424	0.91
27.	Eğitim araçlarını kullanma ve kavrama düzeyimiz disiplinli olmamızı sağlamaz.	1.176	0.53
28.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz etkili karar vermemizde katkı sağlamaz.	1.184	0.58
29.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz sorumluluk alma duygumuzu geliştirmez.	1.136	0.52
30.	Eğitim araçlarını kullanma düzeyimiz bize çok yönlü bakış açısı sağlar.	4.768	0.47

$\bar{X}$ : Ortalama, s.s: Standart Sapma

Tablo 6’da ankete katılmış olan öğrencilerin “Öğrenme-Anlama” yönüyle ilgili verilerinin aritmetik ortalamaları ve standart sapma değerleri bulunmaktadır. Bulunmuş olan bu verilerde (en yüksek 5, en düşük 1) en düşük aritmetik ortalama yaklaşık 1.13 iken, en yüksek aritmetik ortalama ise yaklaşık 4.80 olarak görülmektedir. “Öğrenme-Anlama” yönüne ilişkin 30 görüşün puanlamasının tamamının aritmetik ortalaması ise 3.90 olarak belirlenmiştir.

**Tablo 7.** Öğrencilerin mikroskop kullanım bilgisine yönelik değerlendirmelerinin frekans ve yüzde değerleri.  
**Table 7.** Frequency and percentage values of students evaluations for the use of microscope.

Mikroskop Kullanma Bilgisi Değerlendirme Ölçütü İfadelerin Sıra no	Kesinlikle Katılmıyorum		Katılmıyorum		Kararsızım		Katılıyorum		Kesinlikle Katılıyorum	
	Sayı (f)	Yüzde (%)	Sayı (f)	Yüzde (%)	Sayı (f)	Yüzde (%)	Sayı (f)	Yüzde (%)	Sayı (f)	Yüzde (%)
1.	2	1.6	0	0.0	0	0.0	32	25.6	91	72.8
2.	0	0.0	0	0.0	4	3.2	39	31.2	82	65.6
3.	3	2.4	2	1.6	3	2.4	24	19.2	93	74.4
4.	0	0.0	2	1.6	5	4.0	37	29.6	81	64.8
5.	3	2.4	2	1.6	21	16.8	21	16.8	78	62.4
6.	0	0.0	0	0.0	9	7.2	28	22.4	88	70.4
7.	2	1.6	0	0.0	4	3.2	26	20.8	93	74.4
8.	0	0.0	1	0.8	5	4.0	42	33.6	77	61.6
9.	1	0.8	0	0.0	9	7.2	45	36.0	70	56.0
10.	2	1.6	1	0.8	19	15.2	47	37.6	56	44.8
11.	2	1.6	0	0.0	1	0.8	14	11.2	108	86.4
12.	1	0.8	0	0.0	16	2.9	14	11.3	93	75.0
13.	2	1.6	1	0.8	0	0.0	9	7.2	113	90.4
14.	3	2.4	0	0.0	0	0.0	12	9.6	110	88.0
15.	111	88.8	4	3.2	3	2.4	3	2.4	4	3.2
16.	6	4.8	2	1.6	3	2.4	31	24.8	83	66.4
17.	113	90.4	7	5.6	1	0.8	1	0.8	3	2.4
18.	113	90.4	8	6.4	1	0.8	2	1.6	1	0.8
19.	2	1.6	0	0.0	4	3.2	34	27.2	85	68.0
20.	2	1.6	0	0.0	4	3.2	35	28.0	84	67.2
21.	1	0.8	1	0.8	3	2.4	27	21.6	93	74.4
22.	1	0.8	1	0.8	7	5.6	25	20.0	91	72.8
23.	1	0.8	0	0.0	2	1.6	21	16.8	101	80.8
24.	0	0.0	1	0.8	8	6.4	52	41.6	64	51.2
25.	5	4.0	1	0.8	21	16.8	49	39.2	49	39.2
26.	4	3.2	2	1.6	7	5.6	36	28.8	76	60.8
27.	110	88.0	10	8.0	3	2.4	2	1.6	0	0.0
28.	109	89.2	13	10.4	0	0.0	2	1.6	1	0.8
29.	114	91.2	8	6.4	1	0.8	1	0.8	1	0.8
30.	0	0.0	0	0.0	3	2.4	23	18.4	99	79.2

f: Sayı, %:Yüzde

Öğrencilerin çoğunluğu % 72.8 mikroskop laboratuvarındaki trinokuler başlığa sahip mikroskoptaki verilen eğitimin daha eğitici ve öğretici olduğunu belirtmişlerdir.

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde laboratuvar uygulamalarının öğrencilerin eğitim hayatına ne oranda katkıda bulunduğunun belirlenmesi uygun bir derste meydana getirilen uygulamalar ile mümkün olmaktadır (Yeşilyurt, 2006). Bu yönüyle istenen değerlendirmelerin gerçekleştirilmesi, laboratuvarında kullanılan malzemelerin yüksek performansta kullanılması ile sağlanabilecektir (Köseoğlu ve Soran, 2006). Bu cihazlardan bir tanesi de mikroskoptur. Dolayısıyla derslerdeki mikroskop kullanımını eğitim alanında öğretmen ve öğrenciler için mühim bir rol oynamaktadır (Schroeder ve ark., 2007). Öğrenciler uygulama laboratuvarlarında mikroskop bilgi ve becerileri ile farklı kavramlara ulaşmaktadırlar (Lazarowitz ve Penso, 1992; Udovic ve ark., 2002). Laboratuvar uygulamalarında mikroskoplar, öğrencilerin bilgi birikimi ve kabiliyetlerini geliştiren bir araç olmakla beraber, bu işle uğraşan öğretmen ve öğretim üyeleri tarafından hazırlanan nesnelerin rutin görüntü analizlerinin elde edilmesinde de çoğunlukla kullanılmaktadır (Basey ve ark., 2000). Öğrencilerin laboratuvarlarda kullanılan birçok araç ve gereç ile ilgili kullanım kabiliyetinin bulunması, uygulama derslerini aldıktan sonraki yapılan uygulamaların sıklığına dayanmaktadır. Atıcı ve arkadaşları (2007)'de yaptığı bir araştırma sonucunda mikroskobu kullanma becerisi için öğretmenlerin denetimi ve kılavuzluğunda yapılmasının uygun olduğunu vurgulamışlardır. Buna rağmen Ural Keleş ve arkadaşları (2009)'da yaptıkları bir çalışmada ise öğretmen olacak kişilerin mikroskopta görüntüyü netleştirme ve odaklama gibi konularda eksik bilgilere sahip olduklarını da belirtmişlerdir. Yeşilyurt (2004)'de yapmış olduğu çalışmada ise öğretmen adaylarının mikroskopla daha az vakit geçirdiklerinde olguyu kavrama kabiliyetinde de azalma oluşabileceği kanaatine varmışlardır. Devamında öğrencilerde oluşan pozitif ve negatif algılamalarının birçoğu mikroskopla geçirilen zamanın yetersiz bulunmasından oluştuğu ve yeterli preparat incelenmesiyle bu negatif durumun ortadan kaybolabileceğini bildirmiştir. Ayrıca sağlık bölümleri ile alakalı fakülte ve yüksekokullarda da öğrenim görmekte olan öğrencilerin eğitim öğretim yaşamında yeterli donanım ile tamamlamalarının önemini vurgulamaktadır. Bu gibi olaylarla karşı karşıya kalınmasından dolayı laborant ve veteriner sağlık öğrencilerinin de mikroskop bilgilerinin yeterli düzeyde olması gerekmektedir. Çalışmaların bir öteki yönü mikroskop kullanım bilgi ve birikimini ölçebilmek adına bir kıstas belirlenmiştir. Fitch (2007)'de yaptığı çalışmada uygulamada eğitimcinin önem vermesi gereken durumları daha geniş bir halde detaylandırabilmesi için bu konuda bir ölçüt belirlemesinin oldukça büyük önem taşıdığını belirtmiştir. Bu yönüyle laborant ve veteriner sağlık öğrencilerinin mikroskop kullanım yeteneklerinin

araştırılması bir ihtiyaç olarak görülmüş ve bu çalışma yapılmıştır. Çalışmanın amacı laborant ve veteriner sağlık öğrencilerinin mikroskop kullanım becerilerini tüm sınıflar düzeyinde araştırmak ve belirlemektir. Yaptığımız bu çalışmada ölçeğin öğrenme-anlama boyutuna ilişkin beklentilere baktığımızda yüksek bulunduğunu ve değerlendirdiğimiz 30 ölçütün aritmetik ortalamasının 3.91 olduğunu belirledik. Buna bakılırsa öğrencilerin görüntüleme sistemi yazılımı yüklü bilgisayar ve kamera ataçmanına sahip trinokuler mikroskopların derste kullanılmasına yönelik tutumları yüksek bir aritmetik ortalamada olmakta ve bu da öğrencilerin bu modellerle daha rahat öğrenebileceklerini düşündüklerini göstermektedir. Bunun yanında öğrencilerin "Mikroskop, uygulama derslerinin öğrenim kalitesinin artmasına katkı sağlar" sorusuna verdiği yanıt puanlarının aritmetik ortalamasının 4.80 olduğu ve "Bir derste eğitim araçları kullanılırsa konuyu daha kolay öğrenirim" sorusuna verdiği yanıtların aritmetik ortalamalarının 4.84 olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz bu değerler öğrencilerin modern eğitim araçları ile gördükleri öğrenimin "öğrenme-anlama" boyutunda faydalı olacağını düşünmelerinin yanında kamera ataçmanlı mikroskopların kullanımının öğrenim faaliyetlerinin uygulanmasında vazgeçilmez bulunduğunu düşündüklerinin göstergesidir. Ayrıca bölümümüzde bulunan farklı mikroskoplar ile yapılan uygulama derslerinde 2. sınıfların 1.sınıflara kıyasla derslerde daha başarılı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bu araştırma göstermiştir ki, önlisans düzeyindeki programlarda bilhassa uygulama içerikli konuların yeterince mikroskop kullanılarak derslere dahil edilip yürütülmesi gerektiği kararına varılmıştır. Ayrıca bu programlarda eğitim alan öğrenci adaylarının yeterince fazla uygulama derslerine katılmaları ve deneyim içinde bulunmaları çok önemlidir. Bu yüzden, laborant ve veteriner sağlık öğrencilerinin, meslek yaşamlarını nitelikli olarak yürütebilmeleri ve mikroskobun hastalıklarının teşhisinde önemli bir gereç durumunda bulunmasından dolayı ilgili sahada kullanımının oluşturulabilmesi adına bu program öğrencilerinin mikroskop kullanımını konusunda gerekli becerilere yeterince sahip olması gerektiği anlaşılmaktadır.

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

**Etik Kurul Bilgileri:** AKÜ Sağlık Bilimleri Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu'ndan 2019-39-11 sayılı karar numarası ile izin almıştır. Ayrıca yazarlar Araştırma ve Yayın Etiğine uyulduğunu beyan etmişlerdir. Bu çalışma "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair

Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği HADYЕК iznine tabi değildir.

**Proje Destek Bilgileri:** Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 17.MYO.ALTY.02 numarası ile altyapı projesi olarak desteklenmiştir.

**Açıklama:** Bu çalışma ‘ISPEC 5th international Conference on Agriculture, Animal Husbandry and Rural Development’ kongresinde (2020) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

**Adey P, Shayer M, Yates C.** Thinking Science, Cheltenham, 3rd Ed; Nelson Thornes, 1995.

**Anonim.** Ortaöğretim biyoloji dersi öğretim programı. T.C. milli eğitim bakanlığı talim ve terbiye kurulu başkanlığı, Sayı 34, 2018. <http://mufredat.meb.gov.tr/ProgramDetay.aspx?PID=361>. Erişim tarihi: 12.01.2020.

**Atıcı T, Keskin SN, Özel ÇA.** İlköğretim fen bilgisi ders kitaplarının biyoloji konuları yönünden eleştirel olarak incelenmesi ve öğretmen görüşleri. Türk Eğitim Bilimleri Dergisi. 2007; 5(1):115-131.

**Basey JM, Mendelow TN, Ramos CN.** Current trends of community college lab curricula in biology: an analysis of inquiry, technology and content. Journal of Biological Education. 2000; 34(2):80-86.

**Bayraktar Ş, Erten S, Aydoğdu C.** Fen ve teknoloji öğretiminde öğretmen görüşlerinin değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Eskişehir, 2006.

**Çakal SS.** İlkokullarda Fen Eğitimi Teknolojisi Uygulamalarına İlişkin Öğretmen Görüşlerinin Değerlendirilmesi. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Eskişehir, 1994.

**Dikmenli M, Türkmen L, Çardak O.** Biyoloji laboratuvarlarında mikroskop çalışmaları ile ilgili alternatif kavramları. Ulusal fen bilimleri ve matematik eğitimi kongre bildirisi. ODTÜ, Ankara, 2002.

**Dökme İ, Doğan A, Yılmaz M.** Fen Öğretimi Laboratuvar Uygulamaları II. Palme Yayıncılık Ankara, 2010.

**Ekici G.** Biyoloji öğretmenlerinin laboratuvar kullanımı öz-yeterlilik algılarının incelenmesi. Ahi Evran Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi. 2009; 10(3):25-33.

**Eschenhagen D, Kattmann D, Rodi UD.** Fachdidaktik Biologie. 4th Ed; Kattmann U, Aulis Verlag Deubner, Köln, 1998.

**Fitch GK.** A rubric for assessing a student’s ability to use the light microscope. The American Biology Teacher. 2007; 69(4):211-214.

**Köseoğlu P, Soran H.** Biyoloji öğretmenlerinin araç-gereç kullanımına yönelik tutumları. H.Ü. Eğitim Fakültesi Dergisi. 2006; 30:159-165.

**Lazarowitz R, Penso S.** High school students difficulties in learning biology concepts. Journal of Biological Education. 1992; 26(3):215-223.

**Numanoğlu G.** Bilgi Toplumu, Eğitim, Yeni Kimlikler-II: Bilgi Toplumu ve Eğitimde Yeni Kimlikler. Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi Dergisi. 1999; 32(2):341-350. doi:10.1501/Egifak\_0000001170

**Schroeder CM, Scott TP, Tolson H, Huang TY, Lee YH.** A meta-analysis of national research: effects of teaching strategies on student achievement in science in the united states. Journal of Research in Science Teaching. 2007; 44(10):1436-1460.

**Udovic D, Morris D, Dickman A, Postlethwait J, Wetherwax P.** Workshop biology: demonstrating the Effectiveness of active learning in an introductory biology course. BioScience. 2002; 52(3):272-281.

**Ural Keleş P, Er Nas S, Çepni S.** Fen bilgisi öğretmen adaylarının mikroskop kullanımı ile ilgili kavram yanlışlarının belirlenmesi, 3. Uluslararası Bilgisayar ve Öğretim Teknolojileri Sempozyumu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, 2009.

**Yeşilyurt S.** Biyoloji ve fen bilgisi öğretmen adayları ile lise öğrencilerinin biyoloji laboratuvarlarında mikroskop çalışmalarına dair bilgi düzeyleri üzerine bir araştırma. Erzincan Eğitim Fakültesi Dergisi. 2004; 6(2):83-103.

**Yeşilyurt S.** Öğretmen adayları ve öğretim elemanları gözüyle genel biyoloji laboratuvar uygulamalarının değerlendirilmesi. Kastamonu Eğitim Dergisi. 2006; 14(2):481-496.



## Arterial Vascularization and the Macroanatomic and Histological Structures of the Testis, Penis, and Prostate Gland in Red Foxes (*Vulpes vulpes*)

Gülseren KIRBAŞ DOĞAN<sup>1\*</sup>, Semine DALGA<sup>2</sup>, Yalçın AKBULUT<sup>3</sup>, Kadir ASLAN<sup>4</sup>, Hasan ASKER<sup>5</sup>, Ebru KARADAĞ SARI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Anatomy Department, 36100, Kars, Turkey

<sup>2</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Anatomy Department, 36100, Kars, Turkey

<sup>3</sup>Kafkas University, Medicine Faculty, Anatomy Department, 36100, Kars, Turkey

<sup>4</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Anatomy Department, 36100, Kars, Turkey

<sup>5</sup>Uşak University, Medicine Faculty, Histology and Embryology Department, 64000, Uşak, Turkey

<sup>6</sup>Kafkas University, Veterinary Faculty, Histology and Embryology Department, 36100, Kars, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to examine arterial vascularization and the macroanatomic and histological structures of the testis, penis, and prostate gland in the red fox. Five male red foxes were provided by the Wildlife Rescue and Rehabilitation Center of Kafkas University, Turkey. The arteries supplying the prostate, penis, and testes in the animals were exposed by dissection, the mean length, width, and weight of these organs were measured. After the anatomical features of the testis, penis, and prostate were assessed, tissue samples of each blocked in paraffin then handling standard histological procedures. The internal iliac artery was divided into two branches the caudal gluteal artery, which is the thicker branch and leads dorsally, and the internal pudendal artery, which is the thinner branch and leads ventrally. The testicular artery is asymmetrically separated from both sides of the abdominal aorta at the 5th lumbar vertebra, passes through the spermatic canal, and ends in the testes. It is thought that the findings of this study will contribute information to the literature on artificial insemination, castration, prostate, and urolithiasis surgeries on carnivores.

**Keywords:** Anatomy, Histology, Penis, Prostate gland, Red fox, Testis.

\*\*\*

### Kızıl Tilgilerde (*Vulpes vulpes*) Testis, Penis ve Prostat'ın Arteriyel Vaskülarizasyonu, Makroanatomik ve Histolojik Yapısı

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı kızıl tilgilerde testis, penis ve prostat'ın arteriyel vaskülarizasyonu, makroanatomik ve histolojik yapısını incelemektir. Kafkas Üniversitesi Yaban Hayatı Koruma ve Kurtarma Merkezi'nden 5 adet erkek kızıl tilki temin edildi. Testis, penis ve prostat'ı besleyen arterler diseke edildi. Bu organların ortalama uzunluğu, genişliği, ağırlığı ölçüldü. Testis, penis ve prostat'ın anatomik özellikleri değerlendirildikten doku örneklerine standart histolojik prosedür uygulanarak parafinde bloklandı. İnternal iliak arter, daha kalın dorsal'e yönelen caudal gluteal arter ve daha ince ventral'e yönelen internal pudendal arter olarak ikiye ayrılıyordu. A. testicularis'ler L5 hizasında abdominal aorta'nın iki tarafından asimetrik olarak ayrılıyordu. Spermatic kanal boyunca seyredip testislerde sonlanıyordu. Sunulan çalışmanın bulgularının kızıl tilgiler ve carnivorlarda yapılacak olan suni tohumlama, kastrasyon, prostat ve ürolithiasis operasyonlarına katkıda bulunacağına inanmaktayız.

**Anahtar kelimeler:** Anatomi, Histoloji, Penis, Prostat bezi, Kızıl tilki, Testis.

To cite this article: Kirbaş Doğan G, Dalga S, Akbulut Y, Aslan K, Asker H, Karadağ Sari E. Arterial Vascularization and the Macroanatomic and Histological Structures of the Testis, Penis, and Prostate Gland in Red Foxes (*Vulpes Vulpes*). Kocatepe Vet J. (2021):14(3):293-302

Submission: 01.04.2021 Accepted: 07.06.2021 Published Online: 26.08.2021

ORCID ID; GKID: 0000-0003-3770-9956, SD: 0000-0001-7227-2513, YA: 0000-0003-4661-2224, KA: 0000-0002-7617-0175, HA: 0000-0002-5703-2164, EKS: 0000-0001-7581-6109

\*Corresponding author e-mail: glsrn36@gmail.com

## INTRODUCTION

The red fox (*Vulpes vulpes*) is a carnivorous mammal of the order Carnivora and family Canidae. Red fox is the biggest of the other fox species and the most plenty wild member of the order. It is listed as a species of least concern by the International Union for Conservation of Nature (Demirsoy 1992, Larivière and Pasitschniak-Arts 1996). As for all animals, the red fox's circulatory system, the main elements of which are the heart and vessels, is important for sustaining life.

Testes are two oval-shaped organs located in the scrotum along with the epididymis (Evans and Lahunta, 2013). The tunica vaginalis, which consists of the parietal lamina (*lamina parietalis*) and visceral lamina (*lamina visceralis*), surrounds the testes. The parietal lamina are firmly attached to the scrotum. Below the tunica vaginalis is the tunica albuginea, collagen strands, and large blood vessels. The testicular connective tissue consists of the tunica albuginea, septa of the testis (*septula testis*), and mediastinum testis. The tunica albuginea divides the lobule into the parenchyma through branches called the septa of the testis. The septa converge at the center to form the mediastinum testis (König and Liebich 2015). Although the septa in the cat are thin connective tissue, they form thicker-looking compartments in Canidae, which includes the red fox. Testicular parenchyma consists of the tubuli seminiferi contorti, tubuli seminiferi recti, rete testis, and ductuli efferentes testis (König and Liebich 2015). The testicular artery (*arteria testicularis*) is separated from the abdominal aorta (*aorta abdominalis*) (Dursun 2008, Rerkamnuaychoke et al. 1991). The testicular artery is of the same muscular type as that in bovine (Hees et al. 1984). Together, the testicular artery and testicular vein contribute to the formation of the plexus pampiniformis (Polguy et al. 2009, Polguy et al. 2011). It was indicated the existence of direct communication between the testicular artery and testicular vein in the spermatic cord of cattle, goats, dogs, and boars (Rerkamnuaychoke et al. 1990). On the testes during the reproductive periods of young and adult red foxes has reported that the velocity of the blood flow in the testicular arteries is closely related to testicular weight, except during prepubertal periods (Joffre 1977). In rodents, there is an association between testicular weight and baculum (*os penis*) length (Adebayo et al. 2011).

The penis consists of three parts the radix, corpus, and glans. The glans is divided into the bulbus glandis and pars longa glandis (Evans and Lahunta 2013, Miller 1964). The radix consists of two crus penises that emerge from either side of the ischiatic arch (*arcus ischiadicus*). The crus penises combine to form the corpus penis. The inner structure of the corpus penis comprises a septum made of connective tissue. Although the septum is a perforated sheet of tissue in the carnivore, it also contains slit holes in other types

of animals (Bahadır and Yıldız 2014). There are two types of penis musculocavernous and fibroelastic. In carnivores, the erectile tissue in the musculocavernous type contains a large quantity of blood. In canids, the distal end of the corpus cavernosum has been modified for the *os penis*, in which the urethra in the corpus spongiosum is located. This location of the urethra within the groove of the *os penis* might prevent the passage of urethral stones and cause an obstruction (König and Liebich 2015). The penis is fed by the penis artery (*arteria penis*) and urethral artery (*arteria urethralis*) which separate from the internal pudendal artery (*arteria pudenda interna*) (Dursun 2008).

The prostate gland divides into two parts, corpus prostata and pars disseminate prostatae. The prostate gland is the largest in horses, cats, and dogs. In carnivores, the large, single-lobed prostate, comprises prostate artery (*arteria prostatica*) and middle rectal artery (*arterial rectalis media*), the two branches of the internal pudendal artery (Dursun 2008, König and Liebich 2015). The prostate is large in the dog and it surrounds the entire urethra, and it surrounds a large part of it in the cat (König and Liebich 2015). The secretory alveoli of the prostate gland, which are tubuloalveolar, are arranged radially to the lumen of the urethra and open to the lumen from short channels. The alveoli consist of a single layer of prismatic or cubic epithelium. The proximal part of the channels beginning from the alveoli is covered with transitional epithelium (Özer 2010).

Literature information reporting the morphological and histological features of the reproductive system of the red fox, which has an important place in the wild life, especially in hunting, has not been obtained. There are studies on the male genitalia of Carnivora species (e.g. dog, cat, badger and hoary fox) (Erdoğan 2011, Karan et al. 2010, Mehanna et al. 2018, Saadon 2016), but there are limited studies on the male genitalia of the wild red fox in the literature. Most assisted reproductive technology development studies are used as models of pet dogs and farm foxes from the Canidae family. Farm foxes also have an economic importance in the fur industry. Artificial insemination in fox farming is one of the main methods applied in Scandinavian countries (Amstislavsky et al. 2012). This study aimed to compare the genitalia of the male red fox with that of other carnivora species in hopes to contribute information to the literature on artificial insemination (Yatu et al. 2018), castration, and urolithiasis surgeries in the species. In accordance with this purpose arterial vascularization, macroanatomical and histological structure of testis, penis and prostate were examined.

This study was obtained permission from the General Directorate of Nature Protection and National Parks of the Ministry of Agriculture and Forestry (21264211-288.04/E.893702). Five male red foxes at similar ages (2-4 age) and 2-6 kg weight obtained from Kafkas University Wildlife Rescue and Rehabilitation Center and Kafkas University Veterinary Faculty Clinics were used in the study. These foxes were brought to the clinics because they were either shot or injured in traffic accidents and could not be saved despite all interventions. The study was conducted in the Department of Anatomy and Histology-Embryology of Kafkas University Faculty of Veterinary Medicine.

### Anatomical Investigation

The abdominal aorta was ligated after fixation. Each red fox's arterial system was perfused with physiological saline and red latex (PolyTek, Midwest-Janesville, WI, USA) before fixing the aorta and refrigerated for 10 d to solidify the latex. After solidification, the arteries supplying the testis, penis, and prostate were dissected and photographed using the Kodak Easyshare M320 Digital Camera (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). *Nomina Anatomica Veterinaria 2017* was used for identifications of the vessels. The testes and prostates were weighed using a sensitive balance (min 0.0001 g, max 220 g, precisa code XB220A). The testes, penis, prostate, and os penis were measured by using digital caliper (Company). All morphometric parameters were expressed as Mean  $\pm$  Standard Deviation (SD) in the SPSS (version 20.0) packaged software.

### Histological Investigation

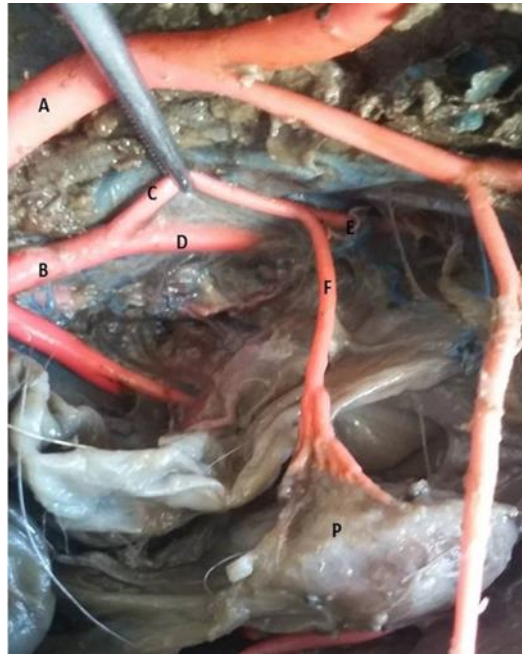
Testis, penis, and prostate tissue samples were fixed in 10% formaldehyde solution for 24 h at room temperature then embedded in paraffin for histological examination. Serial sections were taken at 5  $\mu$ m thickness, and then they were deparaffinized, rehydrated, and stained with Mallory's modified triple staining (Crossmon 1937) to observe the general structure of the testis, penis and prostate gland. The sections were examined using the Olympus BX51 light microscope (Tokyo, Japan).

### Anatomical Results

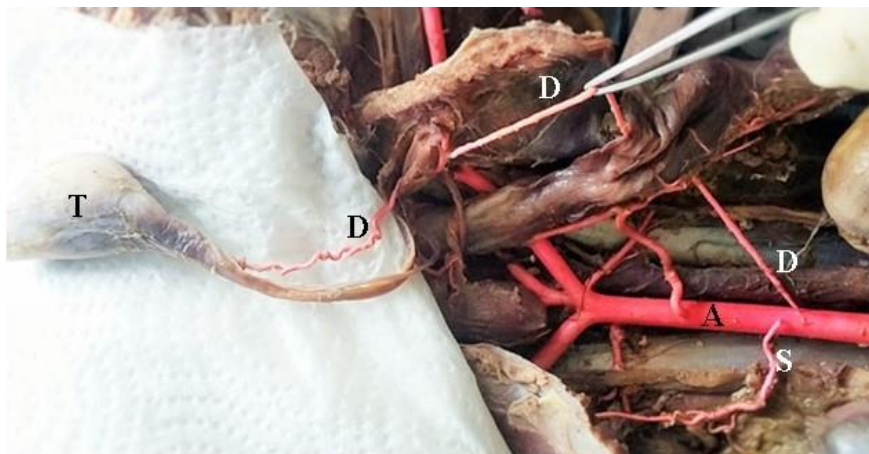
The internal iliac artery (arteria iliaca interna) was separated into its two branches—the caudal gluteal artery (arteria glutea caudalis), which is the thicker branch and leads dorsally, and the internal pudendal artery (arteria pudenda interna), which is the thinner branch and leads ventrally (Fig. 1). The testicular artery separated asymmetrically from both sides of the abdominal aorta at the L5 (fifth lumbar) vertebra (5.50 mm between right and left), passed through the spermatic canal (canalis inguinalis), and terminated in the testes (Fig. 2). The right testicular artery (a. testicularis dextra) was separated from the abdominal aorta before the left testicular artery (a. testicularis sinistra). The mean length of the testis was  $24.67 \pm 4.92$  mm, mean width was  $14.10 \pm 3.77$  mm, and the mean weight was  $2.99 \pm 1.94$  g (Table 1).

The penis artery was separated from the internal pudendal artery and divided into the artery of the bulb of the penis (arteria bulbi penis), deep artery of the penis (arteria profunda penis), and dorsal artery of the penis (arteria dorsalis penis) (Fig. 3). As shown in Fig. 4, the mean os penis length was  $49.53 \pm 5.35$  mm (4.9 cm); the mean penis length was  $96.56 \pm 7$  mm (Table 2). The os penis was thick at the proximal end and thinned toward the distal end, resulting in a cartilage tip. In one in five animals, the penis was found to exhibit sigmoid flexure (flexura sigmoidea penis) 40.90 mm after the ischiatic arch (Fig. 3).

The internal pudendal artery was observed to divide into two branches—the prostate artery and penis artery—while advancing to the ventral rectum. It was also observed that both sides of the prostate artery were divided into two branches before entering the prostate gland (Fig. 5). One branch terminated at the urinary bladder (vesica urinaria) without involving the prostate (middle rectal artery), while the other terminated in the prostate (a. ductus deferens). More branches terminated on the right side of the prostate than on the left side. The length and width of the prostate were measured (Fig. 6). As indicated in Table 3, the mean prostate length was  $17.13 \pm 1.03$  mm, mean width was  $13.04 \pm 3.22$  mm, and the mean weight was  $1.74 \pm 0.77$  g.



**Figure 1:** Arterial system feeding the prostate gland in red foxes (A: a. iliaca externa, B: a. iliaca interna, C: a. pudenda interna, D: a. glutea caudalis, E: a. penis, F: a. prostatica, P: gl. prostatica)



**Figure 2:** Arterial system feeding the testis in red foxes. (A: Aorta abdominalis, D: a. testicularis dextra, S: a. testicularis sinistra, T: Testis)

**Table 1.** Testis measurements in red foxes.

Measurement	RF1		RF2		RF3		RF4		RF5	
	right	left	right	left	right	left	right	left	right	left
<b>Length of testis (mm)</b>	19.45	18.14	28.3	31.05	30.40	29.44	23.65	20.97	25.78	19.56
<b>Mean length of testis (mm)</b>	18.80		29.68		29.92		22.31		22.67	
<b>Width of testis (mm)</b>	9.25	8.96	17.36	17.15	19.01	17.43	15.56	12.59	13.45	10.32
<b>Mean width of testis (mm)</b>	9.105		17.255		18.22		14.05		11.88	
<b>Weight of testis (g)</b>	0.967	0.884	5.280	4.99	4.718	4.871	3.035	2.564	1.53	1.026
<b>Mean weight of testis (g)</b>	0.9255		5.135		4.7945		2.7995		1.278	

RF: Red fox

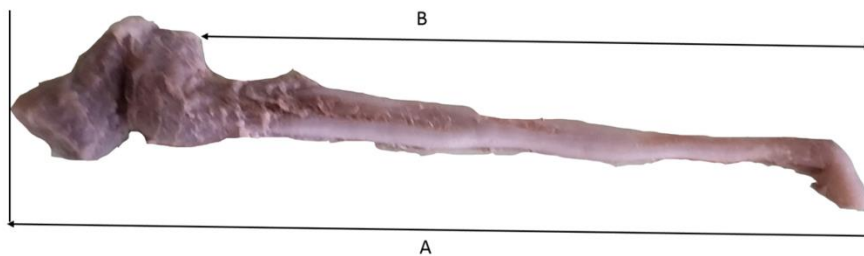
**Table 2.** Penis measurements in red foxes.

Measurement	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	Mean $\pm$ SD
Length of penis (mm)	94.74	93.02	89.35	107.80	97.89	96.56 $\pm$ 7.00
Length of os penis (mm)	42.61	53.74	51.22	46.13	55.45	49.53 $\pm$ 5.35

RF: Red fox, SD: Standard deviation

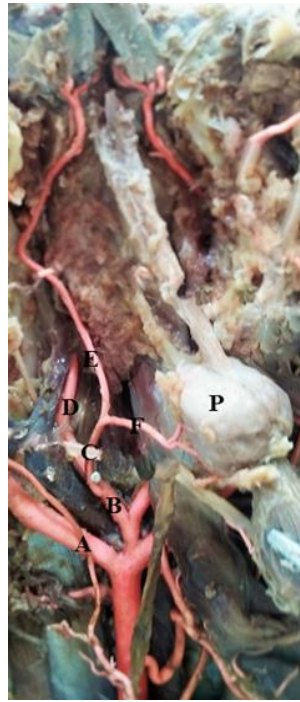


**Figure 3:** A sigmoid flexure was observed in one in five red foxes and penil artery (**A:** a. profunda penis of penil artery).

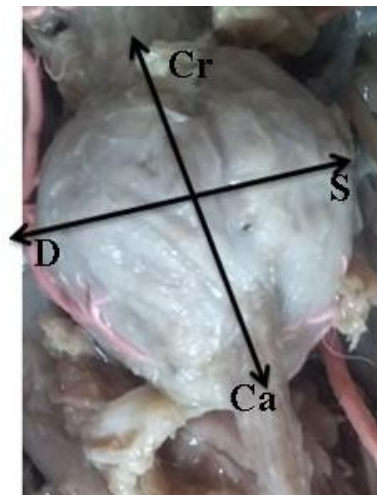


**Figure 4:** Penis and os penis measurements in red foxes (**A:** length of the penis **B:** length of os penis + cartilage end).





**Figure 5:** The arterial feed of penis and prostate gland in red foxes (**A:** a. iliaca externa, **B:** a. iliaca interna, **C:** a. pudenda interna, **D:** a. glutea caudalis, **E:** a. penis, **F:** a. prostatica, **P:** prostate gland).



**Figure 6:** Prostate gland measurements in red foxes (**Cr:** cranial, **Ca:** caudal, **D:** dexter, **S:** sinister).

**Table 3.** Prostate measurements in red foxes.

Measurement	RF1	RF2	RF3	RF4	RF5	Mean ± SD
Length of prostate (mm)	15.60	17.74	17.10	18.34	16.89	17.13 ± 1.03
Width of prostate (mm)	13.56	15.78	16.40	9.03	10.45	13.04 ± 3.22
Weight of prostate (g)	1.545	2.95	1.732	0.8194	1.685	1.74 ± 0.77

RF: Red fox, SD: Standard deviation

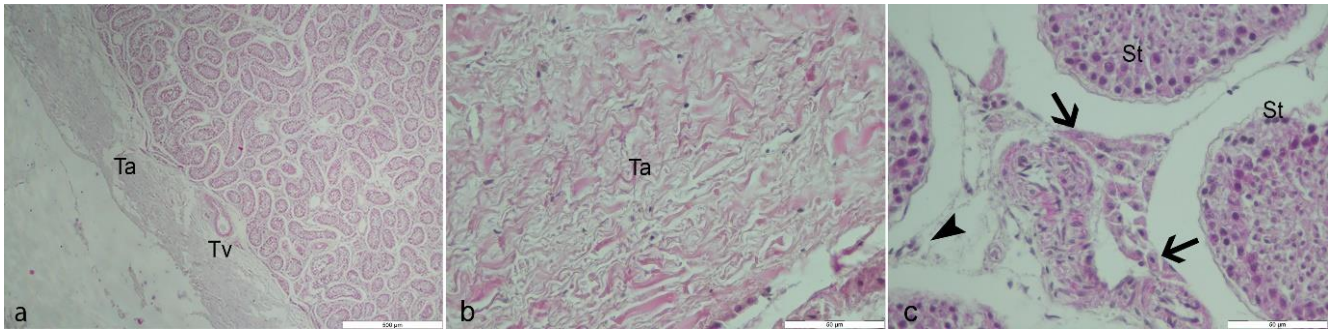
### Histological Results

The testis is surrounded by the external tunica albuginea and tunica vasculosa containing branches of blood vessels in the histological examination. The tunica albuginea is divided into lobes by the septum. Leydig cells were observed among the seminiferous tubules (Fig. 7).

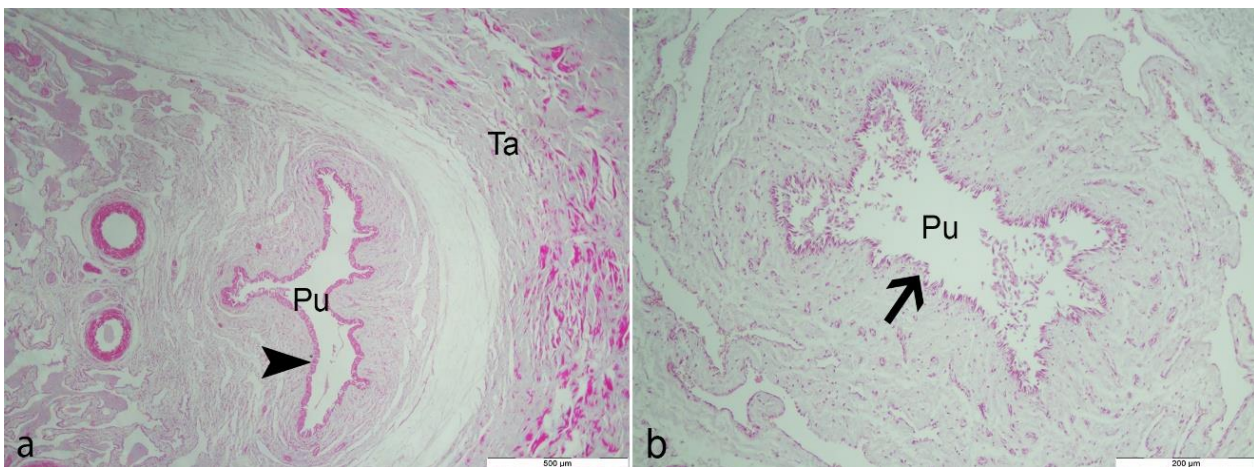
The penis is surrounded by the tunica albuginea, and the penile urethral canal in the root is covered with pseudostratified Columnar epithelium. As it progresses

toward the head of the penis, the epithelium becomes a single layer and columnar (Fig. 8).

The prostate gland is surrounded by a capsule of connective tissue containing smooth muscle cells. The prostate is divided into lobules by trabeculae, and serous tubuloalveolar secretory glands were observed within its lobules. These secretory glands are lined with simple columnar epithelium. Several smooth muscle cells were observed in the interlobular connective tissue (Fig. 9).

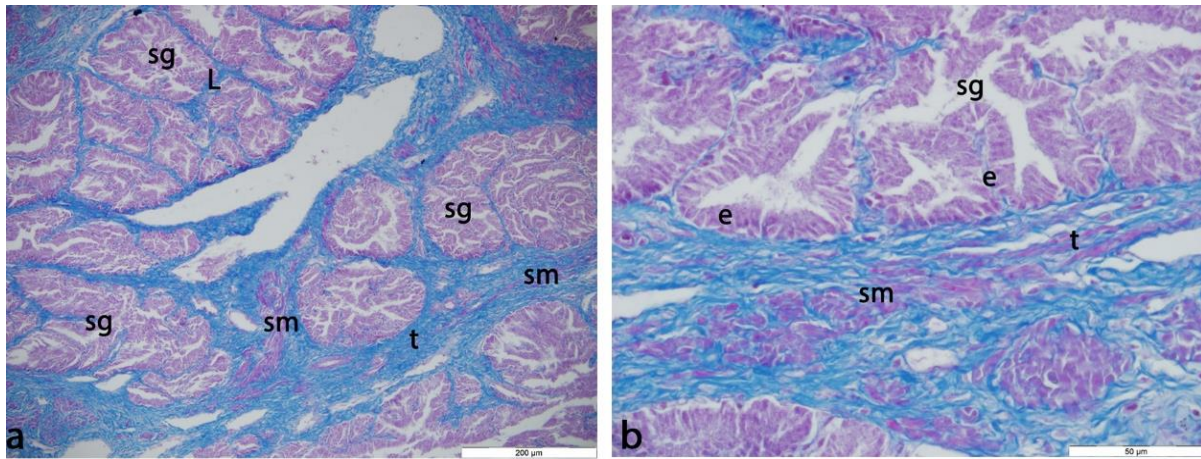


**Figure 7:** a (Bar 500  $\mu\text{m}$ ), b (Bar 50  $\mu\text{m}$ ), c (Bar 50  $\mu\text{m}$ ). Red fox testis. **Ta:** Tunica albuginea, **Tv:** Tunica vasculosa, **St:** Seminiferous tubule, **arrow head:** septum, **arrow:** Leydig cell. Mallory's modified triple staining.



**Figure 8:** a (Bar 500  $\mu\text{m}$ ), b (Bar 200  $\mu\text{m}$ ). Red fox penis. **Pu:** Penis urethra, **Ta:** Tunica albuginea, **Arrow head:** Pseudostratified columnar epithelium, **Arrow:** columnar epithelium, **a:** penis root, **b:** head of penis. Mallory's modified triple staining.





**Figure 9:** a (Bar 200  $\mu\text{m}$ ), b (Bar 50  $\mu\text{m}$ ). Red fox prostate gland. L: Lobules, sg: secretory glands, sm: smooth muscle cells, t: trabecula, e: epithelium. Mallory's modified triple staining.

## DISCUSSION and CONCLUSION

The mean weight of the testes is 8 g in a 25-kg dog (Miller 1964), 1.25 g in rodents (Adebayo et al. 2011), and  $2.99 \pm 1.94$  g in the red fox. The mean length of the testes in dogs is 30 mm (Evans and de Lahunta, 2013) and  $24.67 \pm 4.92$  mm in the red fox, and the mean width is 20 mm in dogs (Miller 1964) and  $14.10 \pm 3.77$  mm in red foxes. The difference between the values is believed to be the result of age, weight, and race differences. The testicular artery separates from the abdominal aorta at the L3–L4 vertebrae in dogs (Nickel et al. 1981), while it separates at the L5 vertebra in the red fox. As observed, these locations between the dog and red fox are very near to each other. Both the endocrine and exocrine glands of the testis of some animal species are covered with a vascular layer called the tunica vasculosa. In dogs and rams, the tunica albuginea is superficial, while in stallions and boars it is profound. In horses, the tunica albuginea may contain smooth muscle fibers (Banks 1993, Bacha and Bacha 2000). In the red fox, the inner surface of the tunica albuginea is covered with a vascular layer; no smooth muscle cells were found.

The mean penis length was  $96.56 \pm 7.00$  mm in red foxes, 170 mm in Iraq dogs (Alaa 2016), 179 mm in all other dogs (Miller 1964), 50 mm in hedgehogs (Atalar and Ceribaşı 2004), 7.17 mm in the Western European hedgehog (Akbari et al. 2018), 54.6 mm in rodents (Adebayo et al. 2011), and 50–80 mm in the cat (König and Liebich 2015). The penis length in the red fox is between the minimum and maximum values of that in other animals within the same family. The length of the os penis is 130 mm (Alaa 2016),  $\geq 100$  mm (Nickel et al. 1981) in some dogs, 5 mm in cats (Bahadır and Yıldız 2014), and 12.6 mm in rodents (Adebayo et al. 2011). The mean length of the os penis in the red fox was  $49.83 \pm 5.35$  mm. The penis and os penis in red foxes appear to be of average length when compared with that in other carnivores. As reported, the os penis thins from the proximal to the distal end and

terminates in a cartilage tip (Gültiken et al. 2004). The penis artery is separate from the internal pudendal artery in male cats and rabbits (Tacı 1992). As reported, it was determined that the penis artery separates from the internal pudendal artery and divides into three branches—the bulb of the penis, the deep artery of the penis, and the dorsal artery of the penis (N.A.V. 2017). A pair of corpus cavernosum, separated by the septum, is observed in the dog penis, and each is reported to be surrounded by tunica albuginea. It has also been reported that the urethra is lined with keratinized stratified squamous epithelium as it progresses toward the head of the penis (Alaa 2016, Akbari 2018). In the red fox, it was determined that the urethral duct originated with pseudostratified columnar epithelium at the root of the penis, and the penile urethra changed into a simple columnar epithelium toward the head of the penis.

The prostate was the only male reproductive gland in red foxes to be reported in the literature (Halgür and Özkadif 2016). The mean weight of the prostate in 25-kg dogs is 6.8 g (Evans and de Lahunta, 2013, Miller 1964), while it is  $1.74 \pm 0.77$  g in red foxes; the mean length is 17 mm in dogs (Evans and de Lahunta 2013, Miller 1964) and  $17.13 \pm 1.03$  mm in red foxes, and the mean width is 26 mm in dogs (Evans and de Lahunta 2013, Miller 1964) and  $13.04 \pm 3.22$  mm in red foxes. Compared to that in the other carnivores studied, the prostate of the red fox is heavier and thinner but the length is similar. In this case, we suggest that the red fox prostate is the same length as that in the dog but weighs less. In the male rabbit, the prostate artery emerges from the caudal gluteal artery and divides into the middle rectal artery and urethral artery. In male cats, the prostate artery is separated from the internal pudendal artery. After dividing into the artery to the ductus deferens (arteria ductus deferentis) and middle rectal artery, it terminates at the lateral face of the prostate (Tacı 1992). In red foxes, the internal

puddendal artery divides into two branches—the prostate and penis arteries—while advancing within the ventral part of the rectum. Both sides of the prostate artery are divided into two branches before entering the prostate gland. While one of these branches, the middle rectal artery, terminates on the urinary bladder without involving the prostate, the other branch, the artery to the ductus deferens, terminates on the prostate. It was found that the course of blood flow in the red fox prostate was the same as that in the cat. Although the prostate is a seromucous gland in most animals (Bacha and Bacha 2000), it was observed that it is a serous gland in red fox like dog. The tubuloalveolar glands are embedded in the fibrous collagenous connective tissue, which includes smooth muscle cells (Kuehnel 2003). The stroma of the canine prostate also contains elastic fibers (Marettová 2017). It has been reported that the epithelium of the secretory glands are simple columnar structures in dogs (Bartsch and Rohr 1980) but are cuboidal to tall columnar epithelial cells in Iraqi dogs (Hussin 2016). It has been demonstrated that the secretory glands are lined with simple columnar epithelium in the red fox prostate. The contents of gland secretions comprise citrate, lactate, and cholesterol (Smith 2008).

In conclusion the arteries supplying the prostate, penis, and testes in red foxes were observed through dissection, their mean measurements were taken, and histological structures were examined. It is believed that the findings of this study will contribute valuable information to the literature on artificial insemination, castration, prostate, and urolithiasis surgeries on red foxes and carnivores.

**Conflict of Interest:** The authors declared that there are no actual, potential, or perceived conflicts of interest for this article.

**Ethical Permission:** Permission was obtained for this study from the Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Nature Conservation and National Parks (21264211-288.04 / E.893702).

**Financial Support:** No support was received from any institution for this study.

**Acknowledgement:** We would like to thank Kafkas University Wildlife Conservation, Rescue and Rehabilitation Center for their support in this study.

**Description:** The summary of this study was presented orally at the 1st International Veterinary Anatomy Congress in Afyon/Sandıklı on 13-16 September 2017.

## REFERENCES

- Adebayo AO, Akinloye AK, Olurode SA, Anise EO, Oke BO.** The structure of the penis with the associated baculum in the male greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*). *Folia Morphol.* 2011; 70(3): 197–203.
- Akbari G, Babaei M, Goodarzi M.** The morphological characters of the male external genitalia of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). *Folia Morphol.* 2018; 77(2): 293–300. DOI: 10.5603/FM.a2017.0098.
- Alaa HS.** (2016). Anatomical and histological study of local dog penis. *M R V S A.* 2016; 5(3): 8-14.
- Amstislavsky S, Lindeberg H, Luvoni GC.** Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in carnivora. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47: 164–175. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01886.x
- Atalar O, Ceribası AO.** (2006). The morphology of the penis in porcupine (*Hystrix cristata*). *Vet Med.* 2006; 51: 66-70.
- Bacha WJ, Bacha LM.** *Color Atlas of Veterinary Histology.* 2th ed. 2000; pp 210.
- Bahadır A, Yıldız H.** *Veterinary Anatomy, locomotor system & internal organs,* 5th ed. Ezgi Bookstore, Bursa, 2014; pp 309-321.
- Banks WJ.** *Applied Veterinary Histology.* 3th ed. Mosby Inc. United States of America.1993; Pp 429.
- Bartsch G, Rohr HP.** Comparative light and electron microscopic study of the human, dog and rat prostate an approach to an experimental model for human benign prostatic hyperplasia (light and electron microscopic analysis) – a review. *Urol. Internat.* 1980; 35: 91-104.
- Crossmon G.** A modification of Mallory’s connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec.*1937; 69: 3-38.
- Demirsoy A.** *Basic Rules of Life, Vertebrates. Volume III / Part II.* Meteksan AŞ, Ankara. 1992.
- Dursun N.** *Veterinary Anatomy II.* Medisan, Ankara. 2008; pp 150-157.
- Erdoğan S.** Distribution of the arterial supply to the lower urinary tract in the domestic tom-cat (*Felis catus*). *Vet. Med.* 2011; 56(4): 202–208. DOI: 10.17221/3147-VETMED
- Evans HE, de Lahunta A.** *Millers anatomy of the dog.* 4th ed. WB Saunders Company, Philadelphia.2013; 367-386.
- Gültiken ME, Yıldız D, Bolat D.** The anatomy of os penis in red fox (*Vulpes vulpes*). *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2004; 51: 71-73.
- Halgür A, Özkadif S.** Anatomical aspect of the fox (*Vulpes vulpes*) male genital organs. 3. International Vetİstanbul Group Congress, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 2016; May 17-20.
- Hees H, Leiser R, Kohler T, Wrobel KH.** Vascular morphology of the bovine spermatic cord and testis I. Light- and scanning electron –microscopic studies on the testicular artery and pampiniform plexus. *Cell and Tissue Res.* 1984; 237: 31-38.
- Hussin AM.** Histological study of prostate in adult indigenouse Iraqi dogs. *J Entomol Zool Stud.* 2016; 4(3): 224-227.
- Joffre M.** Relationship between testicular blood flow, testosterone secretion and spermatogenic activity in young and adult wild red foxes (*Vulpes vulpes*). *J Reprod Fertil.* 1977; 51: 35-40.
- Karan M, Yılmaz S, Atalar Ö, Dinç G.** Light and electron microscopic investigations on the adult badger’s (*Meles meles*) testis. *Fırat Univ Vet J Health Sci.* 2010; 24(2): 77 – 80.

- König HE, Liebich HG.** Veterinary Anatomy (Domestic mammals). 6th ed. Medipres, Ankara. 2015; 413-428.
- Kuehnel W.** Color Atlas of Cytology Histology and Microscopic Anatomy. 4th ed. 2003; 396-398.
- Larivière S, Pasitschniak-Arts M.** Mammalian species *Vulpes vulpes*. A S M. 1996; 537: 1-11.
- Marettová E.** Immuohistochemical localization of elastic system fibers in the canine prostate. *Folia Vet.* 2017; 61(1): 5-10. DOI: 10.1515/fv-2017-0001.
- Mehanna M, Ferreira ALS, Ferreira A, Paz RCR, Morgado TO.** Histology of the testis and the epididymal ducts from hoary fox *Lycalopex vetulus* (LUND, 1842). *Bioscience J.* 2018; 34(6): 1697-1705. DOI: <https://doi.org/10.14393/BJ-v34n6a2018-39395>.
- Miller ME.** Anatomy of the Dog. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 1964; 345-349.
- N.A.V.** International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. *Nomina Anatomica Veterinaria (NAV)*. 6th ed. World Association of Veterinary Anatomists, Hanover (Germany), Ghent (Belgium), Columbia, MO (U.S.A.), Rio de Janeiro (Brazil). 2017.
- Nickel RA, Schummer A, Seiferle E.** The Anatomy of the Domestic Animals. Vol. 3, Berlin-Hamburg, Verlag Paul Parey. 1981; 176-178.
- Özer A.** Veterinary Special Histology (in Turkish). extended 2th ed. Nobel publishing, Bursa. 2010; pp 296-320.
- Polgaj M, Jedrzejewski KS, Topol M.** Angioarchitecture of the bovine spermatic cord. *J Morphol.* 2011; 272: 497-502. DOI: 10.1002/jmor.10929
- Polgaj M, Jedrzejewski KS, Dyl L, Topol M.** Topographic and morphometric comparison study of the terminal part of human and bovine testicular arteries. *Folia Morphol.* 2009; 68: 271-276.
- Rerkamnuaychoke W, Nishida T, Kurohmaru M, Hayashi Y.** Morphological studies on the vascular architecture in the boar spermatic cord. *J Vet Sci.* 1990; 53: 233-239.
- Rerkamnuaychoke W, Nishida T, Kurohmaru M, Hayashi Y.** Evidence for a direct arteriovenous connection (A-V shunt) between the testicular artery and pampiniform plexus in the spermatic cord of the tree shrew (*Tupaia glis*). *J Anat.* 1991; 178: 1-9.
- Saadon AH.** Anatomical and histological study of local dog penis. *M R V S A.* 2016; 5(3): 8-14. DOI: 10.22428/mrvsa.2307-8073.2014.002184.x.
- Smith J.** Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology.* 2008; 70: 375–383. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.039.
- Takci İ.** Comparative macroanatomical investigations on the last branches of the aorta abdominalis (a. iliaca externa, a. iliaca interna ve a. sacralis mediana) of domestic cat and white New Zealand rabbit. PhD thesis, Ankara University Institute of Health Sciences, Ankara, 1992.
- Yatu M, Sato M, Kobayashi J, Ichijo T, Satoh H, Oikawa T, Sato S.** Collection and frozen storage of semen for artificial insemination in red foxes (*Vulpes vulpes*). *J Vet Med Sci.* 2018; 80(11): 1762–1765. doi: 10.1292/jvms.17-0433



## In Silico Analysis of Resistance Gene Identifiers on Plasmids of blaNDM-5 Producing Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated in Humans and Animals

Mehmet Demirci<sup>1</sup>, Akın Yigin<sup>2</sup>, Seda Ekici<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Kirklareli University, Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kirklareli, Turkey

<sup>2</sup>Harran University, Faculty of Veterinary, Department of Genetics, Sanliurfa, Turkey

<sup>3</sup>Veterinary Control Central Research Institute, Ankara, Turkey

### ABSTRACT

Due to their ability to resist endpoint antimicrobials such as carbapenem, it is very important to detect and monitor multi-drug resistant Gram negative strains with plasmids containing genes such as blaNDM-5 by new molecular methods. This study aimed to perform in silico analysis of resistance gene identifiers on human and animal-derived blaNDM-5 plasmids found in open databases, which were analyzed by new whole genome sequencing techniques and to compare these resistance genes. The plasmid genomic sequences of 4 human and 2 animal *E. coli* strains containing blaNDM-5 genes included in our study were analyzed in Silico using the Resistance Gene Identifier (RGI) option of the comprehensive antibiotic resistance gene database using default values. Human and animal strains included in our study were found to have different antimicrobial resistance genes in addition to blaNDM-5. All plasmids were found to have at least 8 perfect antimicrobial resistance gene sequences matches. When the resistance gene identifiers in all plasmids were examined, 35 resistance gene identifiers were found. Besides blaNDM-5, mphA, qacEdelta1 and sul1 were found in all plasmids. As a conclusion, it was determined by our study results that, regardless of the source, there may be different antimicrobial resistance gene identifiers besides the blaNDM-5 resistance gene in plasmids. We are of the opinion that routine molecular surveillance studies should be carried out considering the one health approach of Gram-negative pathogens such as *E. coli*, which can contain plasmids that cause multi-drug resistance and can be isolated from all sources.

**Key words:** blaNDM-5, Carbapenem resistant *E.coli*, in silico analysis, resistance gene identifier.

\*\*\*

### İnsanlardan ve Hayvanlardan İzole Edilen blaNDM-5 Üreten Karbapenem Dirençli *Escherichia coli* Kökenlerinin Plazmidleri Üstünde Bulunan Direnç Gen Tanımlayıcılarının İn Silico Analizi

### ÖZ

Karbapenem gibi son nokta antimikrobiyallere direnç yetenekleri dolayısıyla, blaNDM-5 gibi genler ihtiva eden plazmidlere sahip çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif kökenlerin yeni moleküler yöntemlerle tespiti önemlidir. Biz de çalışmamızda bu yeni tekniklerle tüm genom sekans analizi yapılan ve açık veritabanlarında bulunan insan ve hayvan kaynaklı blaNDM-5 plazmidleri üstünde bulunan direnç gen tanımlayıcılarının in silico analizini yapmayı ve bu direnç genlerini karşılaştırmayı amaçladık. Çalışmamıza dahil edilen 4 insan ve 2 hayvan kaynaklı, blaNDM-5 geni içeren *E.coli* kökenlerine ait plazmid genomik dizileri, varsayılan değerler kullanılarak kapsamlı antibiyotik direnç gen veritabanının, direnç geni tanımlayıcı (RGI) seçeneği kullanılarak bilgisayar ortamında analiz edildi. Çalışmamıza dahil edilen insan ve hayvan kaynaklı kökenlerde blaNDM-5 yanında farklı antimikrobiyal direnç genlerinin de olduğu tespit edildi. Tüm plazmidlerin en az 8 mükemmel antimikrobiyal direnç gen dizisi eşleşmesi gösterdiği saptandı. Tüm plazmidlerde bulunan direnç gen tanımlayıcıları incelendiğinde 35 direnç gen tanımlayıcısı saptandı. blaNDM-5 yanında, mphA, qacEdelta1 ve sul1'in bütün plazmidlerde olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, kaynak fark etmeksizin, plazmidlerde, blaNDM-5 direnç geni yanında farklı antimikrobiyallere direnç gen tanımlayıcılarının da olabildiği çalışma sonucunda tespit edilmiştir. Çoklu ilaç direncine neden olan plazmidleri ihtiva edebilen ve tüm kaynaklardan izole edilebilen *E. coli* gibi Gram negatif patojenler üzerinde tek sağlık yaklaşımı düşünülerek rutin moleküler surveyans çalışmalarının yapılması gerektiği kanaatindeyiz.

**Anahtar Kelimeler:** blaNDM-5, direnç gen tanımlayıcıları, in silico analiz, Karbapenem dirençli *E.coli*

To cite this article: Demirci M, Yigin A, Ekici S. In Silico Analysis of Resistance Gene Identifiers on Plasmids of blaNDM-5 Producing Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated in Humans and Animals. Kocatepe Vet J. (2021);14(3):303-308

Submission: 24.05.2021 Accepted: 18.08.2021 Published Online: xx.x.2021

ORCID ID; MD: 0000-0001-9670-2426, AY: 0000-0001-9758-1697, SE: 0000-0002-7982-5261

\*Corresponding author e-mail: seda.ergen@hotmail.com

## INTRODUCTION

Antimicrobial resistance is a huge threat to public health around the world. Carbapenems; are last-resort treatment options against infections with Cephalosporinase and/or extended spectrum-lactamase producing Gram-negative pathogens showing multi-drug resistance, including Enterobacteriaceae (Huang et al. 2021). These bacteria can produce different carbapenemases to inactivate carbapenems ; Of these, New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) is one of the newly emerging and of serious clinical importance (Zhu et al. 2016). NDM-1 was first identified from a *Klebsiella pneumoniae* strains in India in 2008 (Young et al. 2009). 29 NDM variants have been reported in a short time (Basu, 2020). NDM-5 was discovered in a multi-resistant *Escherichia coli* (*E. coli*) strains in the United Kingdom in 2011 (Hornsey et al. 2011). It differs two amino acid (Val88Leu and Met154Leu) changes with NDM-1 and appears to confer increased resistance to extended-spectrum cephalosporins and carbapenems. The coding of the blaNDM-5 gene in isolates is defined (Zhu et al. 2016). It has been reported that blaNDM-5 is carried in different incompatible type plasmids for transfer, such as IncF, IncN, and IncX3. These plasmids can facilitate the spread of blaNDM-5 among Enterobacteriaceae members through horizontal gene transfer (Li et al. 2018). *E. coli* strains showing multi-drug resistance and producing blaNDM-5 plasmid were identified in human, animal, and food isolates, and plasmids in these strains were sequenced using the whole genome sequencing style (He et al. 2017, Feng et al. 2018, Liu et al. 2018, Xie et al. 2018, Tyson et al. 2019, Marchetti et al. 2020). It is important to determine the surveillance of the resistance profiles of the strains obtained from different disciplines in a one health approach (Aenishaenslin et al. 2021). In our study, we aimed to examine the in silico analysis of resistance gene identifiers with human and animal blaNDM-5 plasmids in the open database and to compare these resistance genes.

## MATERIALS and METHODS

### Plasmid database

In our study, the plasmid genomic sequences of *E. coli* strains of the blaNDM-5 gene whose sequencing has been completed with the whole genome analysis in the NCBI open database, the valid values were used in the comprehensive antibiotic resistance gene database (CARD - <https://card.mcmaster.ca/analyze/rgi>) in resistance gene identifier (RGI) option and in silico analysis was performed. The Comprehensive Antibiotic Resistance Database ("CARD") that provides molecular data and algorithms on key gene markers of antimicrobial resistance was used. The CARD online software provides reference gene sequences and analysis of SNPs in genetic sequences through Antibiotic Resistance Ontology ("ARO"). Resistance gene identifiers (RGI) obtained through the models obtained from the sequencing analysis data can be used for resistome prediction (Alcock et al, 2020). The identified resistance gene were compared in human and animal isolates.

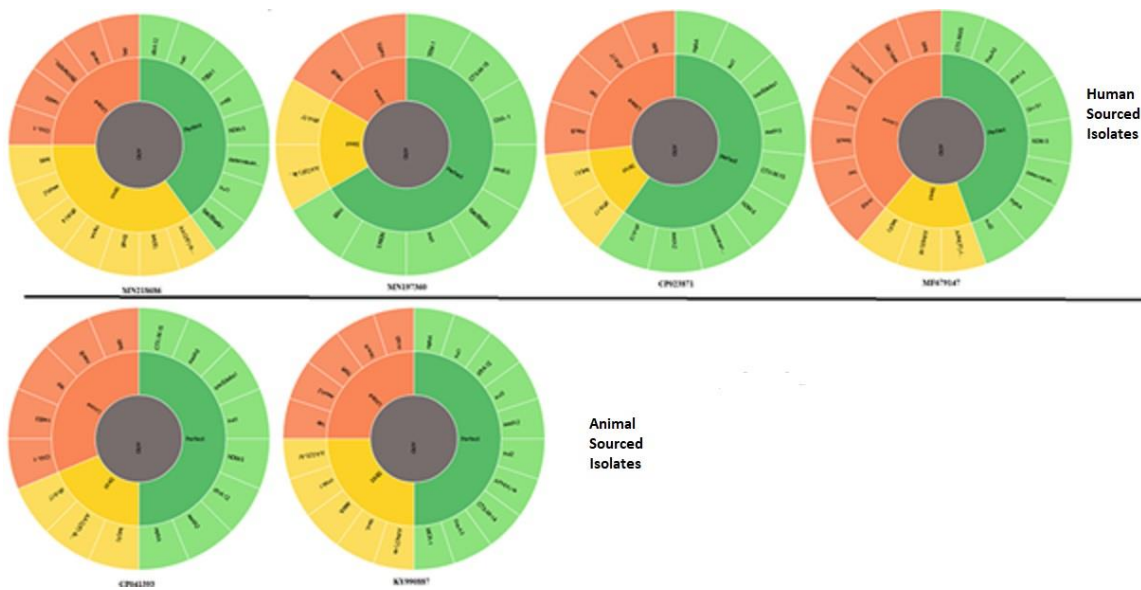
## RESULTS

Information on human and animal sources included in our study are summarized in Table1. After RGI analysis of all genome sequence sequences, it was observed that there are different resistance genes in addition to blaNDM-5 in human and animal sources. It was determined that at least 8 of the resistance gene identifiers in all plasmids showed a perfect (100%) sequence match. Minimum inhibitory concentration (MIC) values for these carbapenem-resistant isolates were also examined and presented in Table1 and Figure1.

When the resistance gene identifiers in all plasmids were examined, 35 resistance gene identifiers were found. Except for blaNDM-5, mphA, qacEdelta1 and sul1 were found in all strains. All genes identified in Table2 are presented comparatively according to human and animal sources. Ten genes causing aminoglycoside resistance were detected on the NDM-5 gene carrying plasmid. It was determined that 50% of the plasmids of both human and animal strains carried an important antimicrobial resistance gene such as blaCTX-M-15.

**Table1.** RGI analysis of whole genome analyzed plasmids containing the blaNDM-5 gene.

NCBI accession number	The living thing from which the origin is isolated	Insulation Material	Carbapenem MIC	Perfect Sequence Match	Strict Sequence Match	Loose Sequence Match	References
CP041393	DOG		4	10	3	5	7
KY990887	COW	Endotracheal Washing Fluid	64	10	5	5	10
MN218686	HUMAN	Cow stool material	16	8	7	6	8
MN197360	HUMAN	Stool material obtained from the baby	16	9	2	2	8
CP023871	HUMAN	Stool material obtained from the baby	64	15	2	8	9
MF679147	HUMAN	Urine material	16	8	3	8	11



**Figure1:** Distribution of resistance gene identifiers obtained from whole genome sequencing data of plasmids carrying with carbapenem resistant blaNDM-5 gene. (Green:Perfect Sequence Match, Red: Strict Sequence Match, and Yellow:Loose Sequence Match).

**Table2.** Genus of gene identifiers found in plasmids detected in human and animal isolates.

Gene name detected on the plasmid	Antimicrobial (s) on which it acts	human source (n: 4)	Percentage (%) of matching region in human-derived plasmids	Animal source (n: 2)	Percentage (%) matched region in animal derived plasmids
<b>AAC(3)-IV</b>	aminoglycoside	0 (%0)		1 (%50)	99.61
<b>AAC(6')-Ib-cr</b>	fluoroquinolone, aminoglycoside	2 (%50)	98.99	1 (%50)	98.99
<b>aadA</b>	aminoglycoside	0 (%0)		1 (%50)	99.61
<b>aadA2</b>	aminoglycoside	2 (%50)	99.8	2 (%100)	100
<b>aadA5</b>	aminoglycoside	3 (%75)	100.0	1 (%50)	100.0
<b>APH(3')-Ia</b>	aminoglycoside	0 (%0)		1 (%50)	98.52
<b>APH(3'')-Ib</b>	aminoglycoside	1 (%25)	99.63	0 (%0)	
<b>APH(4)-Ia</b>	aminoglycoside	0 (%0)		1 (%50)	100
<b>APH(6)-Id</b>	aminoglycoside	1 (%25)	99.28	0 (%0)	
<b>blaCTX-M-14</b>	Cephalosporin	0 (%0)		1 (%50)	100
<b>blaCTX-M-15</b>	Cephalosporin	2 (%50)	100	1 (%50)	100
<b>blaCTX-M-65</b>	Cephalosporin	1 (%25)	100	0 (%0)	
<b>blaNDM-5</b>	carbapenem, cephalosporin, cephamycin, penam	4 (%100)	100	2 (%100)	100
<b>blaOXA-1</b>	carbapenem, cephalosporin, penam	1 (%25)	100	0 (%0)	
<b>blaTEM-1</b>	monobactam, cephalosporin, penam, penem	2 (%50)	100.0	0 (%0)	
<b>BRP(MBL)</b>	Glycopeptide	3 (%75)	100	0 (%0)	
<b>catI</b>	Phenicol	1 (%25)	100	0 (%0)	
<b>cmlA1</b>	Phenicol	0 (%0)		1 (%50)	99.76
<b>dfrA12</b>	Diaminopyrimidine	2 (%50)	100	2 (%100)	100
<b>dfrA14</b>	Diaminopyrimidine	2 (%50)	99.68	0 (%0)	
<b>dfrA17</b>	Diaminopyrimidine	2 (%50)	99.36	1 (%50)	99.36
<b>ErmB</b>	macrolide, lincosamide, streptogramin	1 (%25)	97.96	0 (%0)	
<b>FosA3</b>	fosfomycin	1 (%25)	100	1 (%50)	100
<b>MCR-1.1</b>	peptide antibiotic	0 (%0)		1 (%50)	100
<b>mphA</b>	macrolide	4 (%100)	100	2 (%100)	100
<b>qacEdelta1</b>	acridine paint	4 (%100)	100	2 (%100)	100
<b>qacL</b>	quatarnary ammonium compound	0 (%0)		1 (%50)	93.64
<b>QnrS1</b>	Fluoroquinolone	1 (%25)	100	0 (%0)	
<b>rmtB</b>	aminoglycoside	2 (%50)	100	0 (%0)	
<b>sul1</b>	sulfonamide	4 (%100)	100	2 (%100)	100
<b>sul2</b>	sulfonamide	1 (%25)	100	1 (%50)	100
<b>sul3</b>	sulfonamide	0 (%0)		1 (%50)	100
<b>tet(A)</b>	Tetracycline	2 (%50)	99.74	1 (%50)	99.74
<b>tet(B)</b>	Tetracycline	1 (%25)	99.25	0 (%0)	
<b>tetR</b>	Tetracycline	1 (%25)	100	0 (%0)	

## DISCUSSION

Carbapenems are a class of beta-lactam antibiotics that are active against many aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative organisms. They are critically important antibiotics used to treat serious bacterial infections. Carbapenem resistance is rare and typically results from the production of a carbapenemase enzyme that can hydrolyze penicillins, cephalosporins, monobactams and carbapenems (Tyson et al. 2019). The presence of plasmids that carry the NDM-5 gene can create Pan-resistant *E. coli* strains (He et al. 2017). Moreover, these plasmids can be transferred by conjugation, which has shown that they can be self-infectious (Feng et al. 2018). When the studies on carbapenem resistant *E. coli* strains producing blaNDM-5 were examined; Sun et al. reported in their study in 2019 that they detected blaCTX-M-15 and blaCTX-M-14 genes as well as rmtB and aac (6)-Ib-cr genes in human sources, in addition to blaNDM-5 (Sun et al. 2019). Similarly, among the plasmids we examined in our study, we found that rmtB and aac (6)-Ib-cr genes were detected more frequently, especially in human sources. While blaCTX-M-15 was detected in human and animal sources, blaCTX-M-14 gene was not detected in human sources. Sun et al. reported that they detected the blaCTX-M-64 gene in some of their strains [14]. We could not detect the blaCTX-M-64 gene in our study. Brown et al. (2018) reported that they detected the blaCTX-M-65 gene in Salmonella strains in chicken meat. In our study, we found that blaCTX-M-65 gene was carried in a blaNDM-5 plasmid of *E. coli* strains obtained from a human sample. This has shown us that these genes can switch between bacterial species. Tian et al. (2020) reported that they detected aadA2 and dfrA12 resistance gene cassettes in plasmids containing blaNDM-5, which they detected in children in their study in 2020. In our study, we found that both gene identifiers were found in sources similarly. While these genes were detected in 50% of our human sources, they were found in all of our animal sources. Ramadan et al., (2020) detected blaNDM-5 producing strains in humans and dogs. In the same study, they reported that they detected multiple resistance genes related to  $\beta$ -lactams, aminoglycosides, tetracyclines, quinolones, phenicols, macrolides and folate pathway inhibitors in all isolates. However, they did not find mcr genes in human or dog isolates in this study. In our in silico analysis, we detected the resistance genes for all these antimicrobials in strains from both human and animals. In addition, KY990887 (NCBI accession number), which was obtained from the cow feces samples was carried mcr gene (He et al. 2017). *E. coli* strains carried NDM-5-plasmids with multi-drug resistance, including carbapenem, also reported from environmental sources (Zhao et al. 2021), nutritional sources (Liu et al. 2018) and waters (Liu et al. 2019) except humans and animals.

## CONCLUSION

As a result, multi-drug resistant *E. coli* strains carried blaNDM-5 plasmids can be identified, regardless of the source. Our study results revealed that plasmids belonging to these strains may also have resistance gene identifiers against different antimicrobials in addition to the blaNDM-5 resistance gene. We concluded that routine molecular surveillance studies should be carried out, considering the onehealth approach for Gram-negative pathogens such as *E. coli*, which can carry different plasmids that cause multi-drug resistance

**Etik Kurul Bilgileri :** Çalışma kapsamında etik kurul onay belgesine ihtiyaç bulunmamaktadır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## REFERENCES

- Aenishaenslin C, Häsler B, Ravel A, Parmley EJ, Mediouni S, Bennani H, Buckeridge DL. Evaluating the Integration of One Health in Surveillance Systems for Antimicrobial Use and Resistance: A Conceptual Framework. *Frontiers In Veterinary Science*. 2021;8, 169.
- Alcock BP, Raphenya AR, Lau TTY, Tsang KK, Bouchard M, Edalatmand A, Huynh W, Nguyen AV, Cheng AA, Liu S, Min SY, Miroshnichenko A, Tran HK, Werfalli RE, Nasir JA, Oloni M, Speicher DJ, Florescu A, Singh B, Faltyn M, Hernandez-Koutoucheva A, Sharma AN, Bordeleau E, Pawlowski AC, Zubyk HL, Dooley D, Griffiths E, Maguire F, Winsor GL, Beiko RG, Brinkman FSL, Hsiao WWL, Domselaar GV, McArthur AG. CARD 2020: antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Res*. 2020;48:D517-D525.
- Basu S. Variants of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase: New Kids On The Block 1. 2020 ; 465-467.
- Brown AC, Chen JC, Watkins LKF, Campbell D, Folster JP, Tate H, Friedman CR. CTX-M-65 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Salmonella enterica serotype Infantis, United States. *Emerging Infectious Diseases*. 2018; 24(12), 2284.
- Feng Y, Liu L, McNally A, Zong Z. Coexistence of two blaNDM-5 genes on an IncF plasmid as revealed by nanopore sequencing. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2018 ; 62(5).
- He T, Wei R, Zhang L, Sun L, Pang M, Wang R, Wang Y. Characterization of NDM-5-positive extensively resistant *Escherichia coli* isolates from dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 2017; 207, 153-158.
- Huang YS, Tsai WC, Li JJ, Chen PY, Wang JT, Chen YT, Chang SC. Increasing New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-positive *Escherichia coli* among carbapenem non-



susceptible Enterobacteriaceae in Taiwan during 2016 to 2018. *Scientific Reports*. 2021; 11(1), 1-10

**Hornsey M, Phee L, Wareham DW.** A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2011; 55(12), 5952-5954.

**Li X, Fu Y, Shen M, Huang D, Du X, Hu Q, Yu Y.** Dissemination of bla NDM-5 gene via an IncX3-type plasmid among non-clonal *Escherichia coli* in China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2018; 7(1), 1-9.

**Liu BT, Zhang XY, Wan SW, Hao JJ, Jiang RD, Song FJ.** Characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in ready-to-eat vegetables in China. *Frontiers In Microbiology*. 2018; 9, 1147.

**Liu Z, Xiao X, Li Y, Liu Y, Li R, Wang Z.** Emergence of IncX3 Plasmid-Harboring blaNDM-5 Dominated by *Escherichia coli* ST48 in a Goose Farm in Jiangsu, China. *Frontiers in microbiology*. 2019;10, 2002.

**Marchetti VM, Bitar I, Mercato A, Nucleo E, Bonomini A, Pedroni P, Migliavacca R.** Complete Nucleotide Sequence of Plasmids of Two *Escherichia coli* Strains Carrying blaNDM-5 and blaNDM-5 and blaOXA-181 From the Same Patient. *Frontiers In Microbiology*. 2020; 10, 3095.

**Ramadan H, Gupta SK, Sharma P, Ahmed M, Hiott LM, Barrett JB, Jackson CR.** Circulation of emerging NDM-5-producing *Escherichia coli* among humans and dogs in Egypt. *Zoonoses And Public Health*. 2020; 67(3), 324-329.

**Sun P, Xia W, Liu G, Huang X, Tang C, Liu C, Pan S.** Characterization of blaNDM-5-positive *Escherichia coli* prevalent in a university hospital in eastern China. *Infection And Drug Resistance*. 2019; 12, 3029.

**Tian D, Wang B, Zhang H, Pan F, Wang C, Shi Y, Sun Y.** Dissemination of the blaNDM-5 gene via IncX3-type plasmid among Enterobacteriaceae in children. *Mosphere*. 2020; 5(1).

**Tyson GH, Li C, Ceric O, Reimschuessel R, Cole S, Peak L, Rankin SC.** Complete genome sequence of a carbapenem-resistant *Escherichia coli* isolate with blaNDM-5 from a dog in the United States. *Microbiology Resource Announcements*. 2019; 8(34).

**Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. 2009; 53(12), 5046-5054.

**Xie M, Li R, Liu Z, Chan EWC, Chen S.** Recombination of plasmids in a carbapenem-resistant NDM-5-producing clinical *Escherichia coli* isolate. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018; 73(5), 1230-1234.

**Zhao Q, Berglund B, Zou H, Zhou Z, Xia H, Zhao L, Li X.** Dissemination of blaNDM-5 via IncX3 plasmids in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among humans and in the environment in an intensive vegetable cultivation area in eastern China. *Environmental Pollution*. 2021; 273, 116370.

**Zhu YQ, Zhao JY, Xu C, Zhao H, Jia N, Li YN.** Identification of an NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 in a neonatal patient in China. *Scientific Reports*. 2016; 6(1), 1-8.

## An *In Vitro* Evaluation of the Silage Mixtures Containing Different Levels of White Mulberry Pomace and Meadow Grass

Yeliz KÖKSAL<sup>1</sup>, Bora BÖLÜKBAŞ<sup>2\*</sup>, Zehra SELÇUK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Veterinary Control Central Research Institute, 06020, Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, 55139, Samsun, Turkey

### ABSTRACT

This study was conducted to determine the *in vitro* gas production (GP), organic matter digestibility (OMD), and energy values of ensiled white mulberry pomace (WMP), meadow grass (MG), and the mixtures of the two crops at three different ratios. The silages in WMP/MG mixtures containing 100, 75, 50, 25, and 0% WMP were evaluated by using of ANKOM<sup>RF</sup> GP system. It was observed that increasing levels of WMP in the silages enhanced GP. Whereas the OMD value of WMP silage was highest (53.27%) among all silages, MG silage was the lowest (47.83%). Higher ME, NEL, and OMD values were obtained in WMP and MG mixture silage at a ratio of 75:25 compared with the other mixtures. The results indicated that the OMD, ME, NEL, and non-fiber carbohydrate values were positively correlated with GP-24 h ( $r=0.981$ ,  $r=0.966$ ,  $r=0.981$ , and  $r=0.957$ , respectively). The results of the study showed that the OMD and energy values of WMP100/MG silage were higher than the other silages. In addition, since ensiling of WMP with MG at different ratios will be resulted in increases in OMD and energy values of WMP/MG silages, incorporating unusual silages like WMP/MG silage into diets may provide a benefit to reduce in cost of livestock production.

**Keywords:** *In vitro* gas production, meadow grass silage, mulberry pomace silage, organic matter digestibility.

\*\*\*

### Farklı Düzeylerde Beyaz Dut Posası ve Çayır Otu İçeren Silaj Karışımlarının *In Vitro* Değerlendirilmesi

#### ÖZ

Bu çalışma silolan beyaz dut posası (BDP), çayır otu (ÇO) ve iki ürünün üç farklı oranda karışımlarının *in vitro* gaz üretimi (GÜ), organik madde sindirilebilirliği (OMS) ve enerji değerlerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. %100, 75, 50, 25 ve %0 BDP içeren BDP/ÇO karışım silajları ANKOM<sup>RF</sup> gaz üretim sistemi kullanılarak değerlendirildi. Silajlarda artan BDP seviyelerinin gaz üretimini artırdığı görüldü. BDP silajının OMS değeri tüm silajlar arasında en yüksek iken, ÇO silajının en düşüktü (%47.83). BDP/ÇO'nun 75:25 oranındaki karışım silajında diğer karışımlara göre daha yüksek ME, NEL ve OMD değerleri elde edildi. Sonuçlar OMS, ME, NEL ve selüloz olmayan karbonhidrat değerleri ile GÜ-24 sa arasında pozitif korelasyonun olduğunu gösterdi ( $r=0.981$ ,  $r=0.966$ ,  $r=0.981$  and  $r=0.957$ , sırasıyla). Çalışmanın sonuçları, BDP100/ÇO silajının OMS ve enerji değerlerinin diğer silajlara göre daha yüksek olduğunu göstermiştir. Ayrıca BDP'nin farklı oranlarda ÇO ile silolanması, BDP/ÇO silajlarının OMS ve enerji değerlerinde artışa neden olacağından BDP/ÇO silajı gibi geleneksel olmayan silajların rasyonlara dahil edilmesi hayvansal üretim maliyetinin düşürülmesine katkı sağlayabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Çayır otu silajı, dut posası silajı, *in vitro* gaz üretimi, organik madde sindirilebilirliği.

To cite this article: Köksal Y, Bölükbaş B, Selçuk Z. An *In Vitro* Evaluation of the Silage Mixtures Containing Different Levels of White Mulberry Pomace and Meadow Grass. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3):309-315

Submission: 20.04.2021 Accepted: 06.08.2021 Published Online: 29.08.2021

ORCID ID; YK: 0000-0003-4943-3176 BB: 0000-0002-6060-4514 ZS: 0000-0002-0732-0192

\*Corresponding author e-mail: bora.bolukbas@omu.edu.tr

## INTRODUCTION

Recently, many countries worldwide have focused on recycling industrial by-products to mitigate environmental pollution (Mirzaei-Aghsaghali et al. 2011). Mulberry pomace (MP) is a by-product of the production of mulberry juice such as jam, molasses, etc., and it consists of stem and peel parts of the mulberry. It constitutes approximately 8% of the weight of the fresh mulberry taken into processing (Elmaci and Altuğ 2002). In general, MP is either used as a soil enhancer or discarded in landfills which causes environmental pollution (Zhou et al. 2014).

Meadow grass (MG) is an important roughage used in ruminant nutrition. It can be used as fresh, hay, or silage in the diets. Due to lower soluble carbohydrate content, high buffer capacity, and lower energy value of fresh MG compared to fresh corn or sorghum results in some difficulties during ensiling (Keady et al. 2008). Several studies have been conducted to improve or stimulate silage fermentation by using readily fermentable carbohydrate sources and bacteria inoculants (Atalay and Kamalak 2018, Baytok and Muruz 2003, O'Kiely and Moloney 1994). It has been reported that *Gleditsia triacanthos* that was carbohydrate-rich honey locust and added to MG silage material at the different levels, caused an increase in organic matter digestibility of MG silage (Güven and Kamalak 2011). When the addition of *Gleditsia triacanthos* to silage material at the level of 6 %, metabolizable energy and organic matter digestibility values of silage increased by 8.76 and 11.87%, respectively. Atalay and Kamalak (2018) investigated the effect of the addition of carob (*Ceratonia siliqua*) fractions at the level of 0, 1.5, 3, 4.5, and 6% to MG silage and reported that *in vitro* gas production value increased as the amount of carob fractions (*Ceratonia siliqua*) added to the silages at increasing levels.

*In vitro* cumulative gas production for evaluation of ruminant feeds has provided a measure of organic

matter digestibility and fermentation kinetics of feeds (Storm et al. 2012). It can be used to estimate the energy values of feedstuffs such as straw (Selcuk et al. 2016), silage (Salman et al. 2018), agro-industrial by-products (Mirzaei-Aghsaghali et al. 2011), and tropical feeds (Krishnamoorthy et al. 1995).

Although some vegetable and fruit pomaces such as tomato, orange, or apple are occasionally used in animal nutrition, it is not very common to utilize these sources in diets. However, there is a worldwide shortage of supplying roughage for animal nutrition, and also, traditional diet ingredients of ruminants are generally expensive. Hence, this study was conducted to determine the *in vitro* gas production (GP), organic matter digestibility (OMD), and energy values of the silages in white mulberry pomace WMP/MG mixtures containing 100, 75, 50, 25, and 0% WMP.

## MATERIALS and METHODS

### Silages

The WMP100/MG, WMP75/MG, WMP50/MG, WMP25/MG, and WMP0/MG silages containing 100, 75, 50, 25, and 0% WMP, respectively, were evaluated by the use of ANKOM<sup>RF</sup> GP system. The WMP/MG mixture silages ensiled from WMP and MG were presented in Table 1. Nutrient composition of the silages packed into laboratory mini-silos (glass jars) and stored for 60-d fermentation were documented in detail in the study conducted by Köksal (2020). Dry matter, ash, crude protein, ADF, NDF contents of silage materials were 30.0, 7.71, 12.96, 36.73, 61.69% for MG, and 26.49, 3.85, 11.28, 27.72, 34.34 for WMP, respectively. NFC (Non-fibrous carbohydrate) values of the silages were calculated using the equation of NRC (2001).

$$\text{NFC \%} = 100 - (\text{NDF\%} + \text{CP\%} + \text{EE\%} + \text{Ash\%})$$

**Table 1.** The silages ensiled from WMP and MG

Silages	WMP%	MG%
WMP100/MG	100	0
WMP75/MG	75	25
WMP50/MG	50	50
WMP25/MG	25	75
WMP0/MG	0	100

WMP: White mulberry pomace, MG: Meadow grass

### ***In vitro* Gas Production System**

Rumen fluid for ANKOM<sup>RF</sup> gas production system, used in the study for measuring *in vitro* gas production, was collected from adult cows slaughtered at Florya Slaughterhouse in Samsun, Turkey. Rumen fluid was collected and transferred to the laboratory in a thermos at 39 °C under CO<sub>2</sub> presence. Each unit of the system consisted of a 250 mL glass bottle equipped with an attached module that has wireless communication with the computer. The buffer solutions were prepared according to Menke and Steingass (1988). The prepared buffer solution was firstly warmed and then mixed with

rumen fluid at 4:1. 100 mL of buffered rumen fluid was added to per warmed glass bottle, including 1 g of milled silage samples. After filling, all glass bottles were closed and placed into a water bath at 39±0.5 °C. Preparation of incubation media and the incubation procedure was carried out under anaerobic conditions up to 96 h at 39±0.5 °C. After incubation, the cumulative pressure values of silages at 0, 4, 8, 16, 24, 48, 72, and 96 h were converted to 1 mL of gas at standard pressure and temperature (Menke and Steingass 1988). The equations used to estimate the OMD and the energetic feed value were given below:

$$\text{ME (MJ/kg DM)}=2.2+0.136 \text{ GP}+0.057\text{CP}+0.0029\text{EE}^2$$

$$\text{OMD \%}=148.8+8.89 \text{ GP} +4.5 \text{ CP} +0.651 \text{ A}$$

$$\text{NEL (MJ/kg DM)}=0.1149\text{GP}+0.0054\text{CP}+0.0139\text{EE}-0.0054\text{A}-0.36$$

GP: 24h net gas production (mL/gDM)

CP: Crude protein (g/kg DM)

EE: Ether extract (g/kg DM)

A: Ash (g/kg DM)

### **Statistical Analysis**

According to the result of the Shapiro-Wilk test, all variables showed normal distribution. Levene test was performed to variance homogeneity test. It was determined that variances in all variables were homogeneous. One-way analysis of variance was used for comparison of the groups, and Tukey test was used to determine the differences among groups. The pairwise relationships among variables were evaluated by performing Pearson correlation analysis among variables within and between groups. SPSS (2012) statistical package program was used for statistical analysis.

## **RESULTS**

Whereas the NFC value of fresh WMP was 39.05%, the NFC value of fresh MG was 14.81%. NFC contents of WMP100/MG, WMP75/MG, WMP50/MG, WMP25/MG and WMP0/MG silages were 27.54, 30.41, 24.36, 19.07 and 12.58%, respectively. The GP profiles of all silages were shown in Table 2. There were differences in GP values ( $P<0.05$ ) among the silages throughout the

incubation period (6, 24, 48 h, and 96 h). In all incubation periods, WMP0/MG silage had the lowest GP value, while WMP100/MG silage had the highest ( $P<0.05$ ). It was observed that increasing levels of WMP in the mixtures enhanced GP.

The estimated parameters (OMD, ME, and NEL) were presented in Table 3. *In vitro* OMD of WMP100/MG silage (53.27% of DM) was highest among all silages, whereas WMP0/MG silage (47.83% of DM) had the lowest digestibility. ME (8.27 MJ kg<sup>-1</sup> DM) and NEL (4.56 MJ kg<sup>-1</sup> DM) values of WMP100/MG silage were the highest, whereas ME (6.51 MJ kg<sup>-1</sup> DM) and NEL values (3.07 MJ kg<sup>-1</sup> DM) of WMP0/MG silage were the lowest among all silages ( $P<0.05$ ). WMP75/MG silage had higher ( $P<0.05$ ) ME, NEL, and OMD than those of other silage mixtures.

The correlation parameters were presented in Table 4. The results indicated that the OMD, ME, NEL, and NFC values were positively correlated with GP-24h ( $r=0.981$ ,  $r=0.966$ ,  $r=0.981$ , and  $r=0.957$ , respectively, while the ADF ( $r=-0.871$ ), NDF ( $r=-0.966$ ) contents of the silages were negatively correlated with the GP-24h. Furthermore, when the MP level increased in the silages, NFC, OMD, ME, and NEL values increased ( $P<0.01$ ).

**Table 2.** *In vitro* gas production volumes (mL/0.2 g dry matter) of silages at different incubation times

Hour	WMP100/MG $x \pm Sx$	WMP75/MG	WMP50/MG $x \pm Sx$	WMP25/MG $x \pm Sx$	WMP0/MG
	$Sx$	$x \pm Sx$	$Sx$	$Sx$	$x \pm Sx$
4 h	7.30±0.19 <sup>a</sup>	7.05±0.48 <sup>a</sup>	4.99±0.30 <sup>b</sup>	3.62±0.14 <sup>c</sup>	0.33±0.07 <sup>d</sup>
8 h	10.48±0.10 <sup>a</sup>	9.39±0.18 <sup>b</sup>	6.93±0.06 <sup>c</sup>	4.88±0.14 <sup>d</sup>	3.85±0.21 <sup>e</sup>
16 h	19.41±0.11 <sup>a</sup>	19.37±0.29 <sup>a</sup>	15.34±0.17 <sup>b</sup>	13.43±0.30 <sup>c</sup>	11.03±0.13 <sup>d</sup>
24 h	30.81±0.23 <sup>a</sup>	30.21±0.15 <sup>a</sup>	27.31±0.20 <sup>b</sup>	25.14±0.004 <sup>c</sup>	23.00±0.24 <sup>d</sup>
48 h	38.09±0.10 <sup>a</sup>	34.90±0.09 <sup>b</sup>	33.49±0.14 <sup>c</sup>	32.62±0.19 <sup>d</sup>	31.53±0.07 <sup>e</sup>
72 h	39.63±0.18 <sup>a</sup>	36.95±0.18 <sup>b</sup>	35.96±0.19 <sup>c</sup>	34.52±0.22 <sup>d</sup>	32.90±0.12 <sup>e</sup>
96 h	39.68±0.26 <sup>a</sup>	36.99±0.14 <sup>b</sup>	35.96±0.15 <sup>c</sup>	34.55±0.18 <sup>d</sup>	32.92±0.15 <sup>e</sup>

WMP: White mulberry pomace, MG: Meadow grass

Means in the same line having different superscripts differ significantly (P<0.05)

**Table 3.** Estimated parameters of silages at 24 h gas production

Item	WMP100/MG	WMP75/MG	WMP50/MG	WMP25/MG	WMP0/MG
	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$
OMD	53.27±0.20 <sup>a</sup>	51.99±0.14 <sup>b</sup>	51.14±0.18 <sup>c</sup>	49.52±0.04 <sup>d</sup>	47.83±0.21 <sup>e</sup>
ME	8.27±0.03 <sup>a</sup>	7.66±0.02 <sup>b</sup>	7.32±0.02 <sup>c</sup>	6.86±0.00 <sup>d</sup>	6.51±0.03 <sup>e</sup>
NEL	4.56±0.02 <sup>a</sup>	4.14±0.01 <sup>b</sup>	3.81±0.02 <sup>c</sup>	3.39±0.00 <sup>d</sup>	3.07±0.02 <sup>e</sup>

WMP: White mulberry pomace, MG: Meadow grass, OMD: Organic matter digestibility, ME: metabolisable energy, NEL: net energy lactation

Means in the same line having different superscripts differ significantly (P<0.05)

**Table 4.** The correlations between some parameters of the silages

	OMD	ME	NEL	GP <sub>24h</sub>	ADF	NDF	CP	NFC	WMP level
OMD		**	**	**	**	**	NS	**	**
ME	0.981		**	**	**	**	NS	**	**
NEL	0.989	0.998		**	**	**	NS	**	**
GP <sub>24h</sub>	0.981	0.966	0.981		**	**	NS	**	**
ADF	-0.885	-0.956	-0.936	-0.871		**	NS	**	**
NDF	-0.964	-0.914	-0.938	-0.966	0.766		NS	**	**
CP	-0.375	0.410	0.368	0.200	-0.440	-0.238		NS	NS
NFC	-0.922	0.866	0.898	0.957	-0.709	-0.984	0.061		**
WMP level	0.985	0.993	0.997	0.983	-0.310	-0.948	0.339	0.913	

OMD: Organic matter digestibility, ME: Metabolizable energy, NEL: Net energy lactation, GP<sub>24h</sub>: Gas production at 24 h, ADF: Acid detergent fiber, NDF: Neutral detergent fiber, CP: Crude protein, NFC: Non fiber carbohydrate, MP: White mulberry pomace, NS: none significant, \*\*P<0.01

## DISCUSSION

Ruminants can effectively utilize carbohydrate-rich agro-industrial by-products thanks to rumen microorganisms. These carbohydrates are fermented by microorganisms and converted into energy sources such as glucose and volatile fatty acids. Since fresh fruits are seasonal, ensiling their pomaces with conventional roughages and incorporating them into ruminant diets can be an effective method. Although numerous studies have been conducted on the nutritional content of WMP, little is known about its ensiled properties (Zhou et al. 2012). Due to the scarcity of data on WMP silage or the partial use of WMP as a silage material, results from other agro-industrial by-products were used to compare digestibility, GP, and energy.

*In vitro* GP is an effective parameter commonly used to predict the potential nutritional value of feedstuffs. The GP volume of feeds after 24 h incubation is used to estimate digestibility, ME, and NEL values (Menke and Steingass 1988). The feedstuffs typically produce more than 80% of total GP in the first 24 h of incubation (Tagliapietra et al. 2015). In accordance with this information, 70-80% of total GP in all silages is produced within the first 24 h. In the current study, the highest GP was in WMP100/MG silage during all incubation periods, and the lowest GP was in WMP0/MG silage. Moreover, GP increased in direct proportion to silage WMP levels. The increased GP by adding pomaces agrees with previous reports (Besharati et al. 2017, Canbolat et al. 2010) and could be explained by the fact that the higher silage NFC content and increased carbohydrate fermentation. Feeds with a high NFC level produce more gas because rumen microbes can ferment the soluble fractions of the feedstuff more easily (Blümmel and Becker 1997). Additionally, increased GP could be linked to improved silage quality (Hetta et al. 2007), which would also influence microbial access to fermentable carbohydrates in the rumen.

Zhou et al. (2012) reported that the GP of WMP silage at the 48 h was 18.7 mL/0.2 g DM, which was relatively lower than those found in the current study (38.09 mL/0.2 g DM). These different results might be attributed to two possible reasons: the difference in the nutrient content of the ensiled fresh material and the ensiling method used. The gas volume of WMP100/MG (30.81 mL/0.2 g DM) after 24 h of incubation was comparable to the values reported by Kara et al. (2018) for pomegranate pomace (29.29 mL/0.2 g DM) and apple pomace (32.44 mL/0.2 g DM). Despite the similarities in gas productions between the two studies, our findings indicate that WMP100/MG silage had higher OMD (53.27%), ME (8.27 MJ/kg DM), and NEL (4.56 MJ/kg DM) values than pomegranate and apple pomace reported by Kara et al. (2018).

Pirmohammadi et al. (2006) and Ülger et al. (2018) reported that *in vitro* OMD values of apple pomace silages were 57.5 and 62.32 %, respectively. Ülger et al. (2018) stated that the ME and NEL values of apple pomace silage were 8.37 and 4.18 MJ/kg DM, which was similar to the value of WMP100/MG silage in our study. The result of the present work for OMD value was also similar to those of Pirmohammadi et al. (2006). Ülger et al. (2018) reported that ME and NEL values of corn silage were the lowest among the apple pomace/corn silage mixtures, which was similar to our result for MP0/MG silage. Furthermore, the silages in WMP/MG mixtures containing 100, 75, 50, 25, and 0% WMP resulted in a decrease in the OMD and energy values of the silages. Many factors such as differences in evaluated materials as a pomace or silage, varied processing methods of fruits, and nutrient contents of pomaces may explain differences in OMD, ME, and NEL values between this study and others. However, the differences in OMD and energy values of the evaluated silages in the current study were attributed to the difference in their nutritional components caused by the different levels of WMP and MG.

Lactic acid bacteria (LAB) can convert water-soluble carbohydrates into organic acids (primarily lactic acid) during the ensiling process, allowing for rapid pH reduction of silage. A low pH and anaerobic environment can inhibit the activities of undesirable microbes and preserve nutrients (Chen et al. 2020). Since pomaces have high water-soluble carbohydrate contents, ensiling them with roughages that have high buffer capacity increases silage quality and nutritional values (Ke et al. 2015). Canbolat et al. (2010) reported that increasing levels of grape pomace added to alfalfa silage increased the OMD and ME values of the silages. In accordance with this study, we found that the GP, OMD, ME, and NEL values increased with the elevated levels of MP in the silage. After 96 h of incubation, WMP75/MG silage, which contains a higher proportion of WMP, produced more gas and had higher OMD, ME, and NEL values than WMP50/MG and WMP25/MG silages. Our findings were consistent with those of some studies (Kara et al. 2018, Zhou et al. 2012), which indicated that pomaces are fermented quickly and have the potential to produce more gas than several roughages.

There is a strong relationship between the nutrient content of feeds and *in vitro* cumulative GP. Getachew et al. (2004) reported that the NFC content of feeds was positively correlated with GP and estimated parameters (OMD and ME), whereas feed CP and NDF levels were negatively correlated. Similarly, we found a positive correlation between GP and NFC, ME, OMD, NEL values and a negative correlation with NDF and ADF values. However, there were no correlations with CP. According to Canbolat and Karaman (2009), increased NDF and ADF contents, which were difficult to dissolve in the

rumen, reduced gas production and OMD by limiting microbial fermentation. As the WMP increased in the silages in the current study, the NDF and ADF content of silages decreased. This may explain the negative correlation between GP and NDF, ADF contents, and the positive correlation between GP and WMP level.

## CONCLUSION

The study results showed that WMP increased OMD and energy values in silage mixtures. Therefore, incorporating unusual and economical silages like WMP/MG mixture into ruminant diets may provide a benefit to reduce livestock production costs.

**Ethical Statement:** This study does not present any ethical concerns.

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

## REFERENCES

Atalay AI, Kamalak A. Effect of Locust Bean Fracture on *In vitro* and In situ Degradation of Grass Silage. *Iğdır Univ. Fen Bilim. Enst. Derg.* 2018;8(4): 361–7.

Baytok E, Muruz H. The effects of formic acid or formic acid plus molasses additives on the fermentation quality and DM and ADF degradabilities of grass silage. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2003;27(2): 425–31.

Besharati M, Shafipour N, Abdi E, Nemati Z. Effects of supplementation alfalfa silage with molasses, orange pulp and *Lactobacillus buchneri* on *in vitro* dry matter digestibility and gas production. *J. Biosci. Biotechnol.* 2017;6(1): 43–7.

Blümmel M, Becker K. The degradability characteristics of fifty-four roughages and roughage neutral-detergent fibres as described by *in vitro* gas production and their relationship to voluntary feed intake. *Br. J. Nutr. Cambridge University Press;* 1997;77(5): 757–68.

Canbolat Ö, Kalkan N, Karaman Ş, Filya I. The investigation of possibility of grape pomace as carbohydrate source in alfalfa silages. *Kafkas Univ Vet Fak.* 2010;16(2): 269–76.

Canbolat Ö, Karaman Ş. Comparison of *in vitro* Gas Production, Organic Matter Digestibility, Relative Feed Value and Metabolizable Energy Contents of Some Legume Forages. *J. Agric. Sci.* 2009;15(02): 188–96.

Chen L, Qu H, Bai S, Yan L, You M, Gou W, Li P, Gao F. Effect of wet sea buckthorn pomace utilized as an additive on silage fermentation profile and bacterial community composition of alfalfa. *Bioresour. Technol.* 2020;314: 123773.

Elmacı Y, Altuğ T. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *J. Sci. Food Agric.* 2002;82(6): 632–5.

Getachew G, Robinson PH, DePeters EJ, Taylor SJ. Relationships between chemical composition, dry matter degradation and *in vitro* gas production of several ruminant feeds. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2004;111(1–4): 57–71.

Güven İ, Kamalak A. Gladiçya Meyvesinin Çayırotu Silajında Kullanımı. *Black Sea J. Eng. Sci.* 2011;4(1): 22–8.

Hetta M, Cone JW, Bernes G, Gustavsson A-M, Martinsson K. Voluntary intake of silages in dairy cows depending on chemical composition and *in vitro* gas production characteristics. *Livest. Sci.* 2007;106(1): 47–56.

Kara K, Guclu BK, Baytok E, Aktug E, Oguz FK, Kamalak A, Atalay AI. Investigation in terms of digestive values, silages quality and nutrient content of the using pomegranate pomace in the ensiling of apple pomace with high moisture contents. *J. Appl. Anim. Res.* 2018;46(1): 1233–41.

Ke WC, Yang FY, Undersander DJ, Guo XS. Fermentation characteristics, aerobic stability, proteolysis and lipid composition of alfalfa silage ensiled with apple or grape pomace. *Anim. Feed Sci. Technol.* 2015;202: 12–9.

Keady TWJ, Kilpatrick DJ, Mayne CS, Gordon FJ. Effects of replacing grass silage with maize silages, differing in maturity, on performance and potential concentrate sparing effect of dairy cows offered two feed value grass silages. *Livest. Sci.* 2008;119(1–3): 1–11.

Köksal Y. Dut posasının çayır otu ile silolanmasının silaj kalitesine ve sindirilebilirliği üzerine etkilerinin araştırılması. PhD thesis, Ondokuz Mayıs University, Health Science Institute, Samsun, 2020.

Krishnamoorthy U, Soller H, Steingass H, Menke KH. Energy and protein evaluation of tropical feedstuffs for whole tract and ruminal digestion by chemical analyses and rumen inoculum studies *in vitro*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1995;52(3–4): 177–88.

Menke KH, Steingass H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Anim. Res. Dev.* 1988;28: 7–55.

Mirzaei-Aghsaghali A, Maheri-Sis N, Mansouri H, Razeghi ME, Shayegh J, Aghajanzadeh-Golshani A. Evaluating nutritional value of apple pomace for ruminants using *in vitro* gas production technique. *Ann. Biol. Res.* 2011;2: 100–6.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed., The National Academic Press, Washington DC, USA. 2001.

O’Kiely P, Moloney AP. Silage characteristics and performance of cattle offered grass silage made without an additive, with formic acid or with a partially neutralised blend of aliphatic organic acids. *Irish J. Agric. Food Res.* 1994; 25–39.

Pirmohammadi R, Rouzbehan Y, Rezayazdi K, Zahedifar M. Chemical composition, digestibility and *in situ* degradability of dried and ensiled apple pomace and maize silage. *Small Rumin. Res.* 2006;66(1–3): 150–5.

Salman M, Muruz H, Cetinkaya N, Selcuk Z, Kaya I. Effects of the addition of essential oils cuminaldehyde, eugenol, and thymol on the *in vitro* gas production and digestibility of alfalfa (*Medicago sativa* L.) silage. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2018;42(5): 395–401.

Selcuk Z, Cetinkaya N, Salman M, GENÇ B. The determination of *in vitro* gas production and metabolizable energy value of rice straw treated with exogenous fibrolytic enzymes. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.* 2016;40(6): 707–13.

SPSS (2012). IBM SPSS statistics for Windows, version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.

Storm IMLD, Louise A, Hellwing F, Nielsen NI, Madsen J. Methods for Measuring and Estimating Methane Emission from Ruminants. *Animals.* 2012;2: 160–83.

Tagliapietra F, Cattani M, Guadagnin M, Haddi ML, Sulas L, Muresu R, Squartini A, Schiavon S, Bailoni L. Associative effects of poor-quality forages combined with food industry by-products determined *in vitro* with an



automated gas-production system. Anim. Prod. Sci. 2015;55(9): 1117–22.

**Ülger I, Kaliber M, Ayaşan T, Küçük O.** Chemical composition, organic matter digestibility and energy content of apple pomace silage and its combination with corn plant, sugar beet pulp and pumpkin pulp. S. Afr. J. Anim. Sci. 2018;48(3): 497–503.

**Zhou B, Meng QX, Ren LP, Shi FH, Wei Z, Zhou ZM.** Evaluation of chemical composition, in situ degradability and *in vitro* gas production of ensiled and sun-dried mulberry pomace. J. Anim. Feed Sci. 2012;21(1): 188-197

**Zhou Z, Zhou B, Ren L, Meng Q.** Effect of ensiled mulberry leaves and sun-dried mulberry fruit pomace on finishing steer growth performance, blood biochemical parameters, and carcass characteristics. PLoS One. 2014;9(1).

## Pigeon in Konya Province Folklore: 2. Breeding

Esra ÇELİK<sup>1\*</sup>, Aşkın YAŞAR<sup>1</sup>, Emine Merve DANIŞ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Selçuk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary History and Deontology, 42003, Konya, Turkey

### ABSTRACT

In this study, it was aimed to verbal, written and visual data, which are folkloric characteristics of pigeon breeding in Konya, by bringing it into the literature and contribute to the Turkish folklore. The material of the study was composed of the information obtained from 28 source persons, consisting of pigeon breeders in Konya province, through the “Information Collection Form”. The findings of the study are given under the headings of sheltering and care, feeding and breeding. It was determined that, the data of the study are similar to the data obtained through the literature reviews, the words “badanas”, “guğurmak”, “toslamak”, “cilk”, “damarlı”, “hamurlama” and “tüleme” are still used in Konya with the same meanings and some of the breeding practices were rational. As a result, it can be said that the folkloric information obtained in the study is generally compatible and rational with scientific data.

**Keywords:** Breeding, folklore, folkloric veterinary medicine, Konya, pigeon

\*\*\*

### Konya İli Folklorunda Güvercin: 2. Yetiştiricilik

#### ÖZ

Bu çalışmada, Konya ili güvercin yetiştiriciliğine yönelik folklorik niteliği olan sözlü, yazılı ve görsel verilerin literatüre kazandırılarak Türk folkloruna katkı sağlanması amaçlandı. Çalışmanın materyalini, “Bilgi Derleme Formu” aracılığıyla Konya ilinde güvercin yetiştiricilerinden oluşan 28 kaynak kişiden elde edilen bilgiler oluşturdu. Çalışmanın bulguları güvercinlerde barınma ve bakım, besleme ve üreme başlıkları altında verildi. Çalışma verilerinin, gerçekleştirilen literatür taramaları ile elde edilen verilere benzerlik gösterdiği, “badanas”, “guğurmak”, “toslamak”, “cilk”, “damarlı”, “hamurlama” ve “tüleme” kelimelerinin Konya’da hala aynı anlamlarda kullanıldığı ve bazı yetiştirme uygulamalarının rasyonel nitelik taşıdığı belirlendi. Sonuç olarak, çalışmada elde edilen folklorik bilgilerin bilimsel veriler ile genel olarak uyumlu ve rasyonel nitelik taşıdığı söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Folklor, folklorik veteriner hekimliği, güvercin, Konya, yetiştiricilik

To cite this article: Çelik E, Yaşar A, Daniş E.M. Pigeon in Konya Province Folklore: 2. Breeding. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3):316-324

Submission: 28.01.2021 Accepted: 03.06.2021 Published Online: 02.09.2021  
ORCID ID; EÇ: 0000-0002-7836-6171, AY: 0000-0001-8641-6207, EMD: 0000-0003-0296-4391  
\*Corresponding author e-mail: esra.celik@selcuk.edu.tr

## GİRİŞ

Evcilleştirilen ilk kuş türü olarak bilinen güvercinler M.Ö. yaklaşık 4500'li yıllardan itibaren farklı amaçlar için yetiştirilmeye başlanmıştır (Yılmaz ve ark. 2014, Garip 2017). Bu süreçte güvercin yetiştiriciliği, başlıca iletişim (Özkul ve Yerlikaya 2008, Garip 2017), tüketim, deney hayvanı, süs ve spor (Sales ve Janssens 2003, Garip 2017) gibi amaçlarla sürdürülmüş olup günümüzde hobi, yarış (Yılmaz ve Boz 2012) ve tarımsal amaçlarla devam etmektedir (Bekleyen 2007). Türk tarihinde 13. yüzyıldan günümüze kimi zaman güvercinleri tehlikelerden korumak, kimi zaman da onlardan çeşitli amaçlar doğrultusunda faydalanmak için özel barınaklar yapılmıştır. Bu barınaklar “kuşevleri” ve “güvercin evleri” olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır. Kuş yuvalarının yapılış tarzları, yapıldığı yerler ve dönemler ayrıntılı bir şekilde incelendiğinde yapıldıkları dönemin sosyo-kültürel özelliklerinden izler taşıdıkları bildirilmiştir (Özen 2012). Ayrıca Anadolu’da çok değerli olan güvercin gübresinden faydalanmak için de farklı barınak modelleri yapılmıştır (Bekleyen 2007).

Konya ilinde güvercin yetiştiriciliği oldukça eski bir geçmişe sahiptir. Bu konuda kesin belgeler bulunmamakla birlikte, yerleşik kuşçuluk gelenekleri Konya’da güvercin yetiştiriciliğinin Selçuklular dönemine kadar uzandığını göstermektedir (Özmen 1981, Garip 2017).

Bu çalışma ile Konya ili güvercin yetiştiriciliğine yönelik folklorik niteliği olan sözlü, yazılı ve görsel verilerin literatüre kazandırılarak Türk folkloruna katkı sağlanması amaçlandı.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmanın örnekleme ve veri toplama aracına ilişkin bilgi ile kaynak kişi listesi “Konya İli Folklorunda Güvercin: 1. Hastalıklar ve Tedavileri” (Yaşar ve ark. 2021) başlıklı makalede detaylı olarak sunuldu.

Bu çalışmada veri toplama aracı olarak geliştirilen “Bilgi Derleme Formu” parametrelerinden “barınma ve bakım, besleme, üreme” ile ilgili olan veriler kullanıldı.

Çalışmanın materyalini, Meram Güvercin Severler Derneği Başkanı tarafından güvercin yetiştiriciliğinde tanınan ve bilgi sahibi olduğu bildirilen 28 kaynak kişiden elde edilen yazılı, sesli ve görsel folklorik bilgiler oluşturdu. Yazılı ve görsel materyali, bilgi derleme formu aracılığıyla 11.07.2020-14.08.2020 tarihleri arasında elde edilen bilgiler oluşturdu. Görsel materyal kaynak kişilere ait güvercin yetiştirme alanlarından fotoğraflanarak elde edildi ve kaynak kişilerden izin alınarak kullanıldı.

Güvercin yetiştiriciliği ile ilgili elde edilen folklorik veriler içerik analizi yöntemi ile değerlendirildi. Görüşme yapılan tüm kaynak kişiler ilçe ve görüşme tarihine göre kodlanarak (K1, K2, ..., K28) metin içerisinde üst indis şeklinde belirtildi ve sonnot bölümünde sunuldu.

## BULGULAR

Güvercin yetiştiriciliği ile ilgili elde edilen bulgular barınma ve bakım, besleme ve üreme başlıkları altında sunuldu.

### Barınma ve Bakım

Konya ilinde güvercin barınaklarına “kuş kümesi”<sup>1</sup> (Resim 1) denir ve barınaklar çoğunlukla ahşap ve kerpiç<sup>2</sup> malzemeden yapılır. Kümesler güvercinlerin sayısına ve özelliklerine göre farklı şekillerde tasarlanmalıdır. Taklacı güvercinlerde damızlık ve uçum kümesleri ayrı olmalı<sup>3</sup>, ana ve baba damızlık kümesine, yavrular ise uçum kümesine alınmalıdır.<sup>4</sup> Uçum kümesleri çok yüksek, geniş ya da dar (2x2x2 m)<sup>5</sup> olmamalıdır. Damızlık güvercinler hiç uçurulmamalı, sadece geniş ve aydınlık kümeslerde damızlık nitelikleri için yetiştirilmelidir. Süs güvercinlerinin tüy yapısının sağlıklı olması için kümes alanı geniş olmalıdır.<sup>6</sup>



Resim 1. Kümes alanı<sup>7</sup>

Figure 1. Poultry area

Güvercinlerin bakımı için günlük en az iki saat<sup>8</sup>, eğitimleri için ise yaklaşık üç-beş saat zaman ayrılır.<sup>9</sup> Yarışmalara hazırlanan güvercinler en az bir ya da bir buçuk senelik eğitim periyodundan geçer.<sup>10</sup>

Güvercinlerin bakımında barınak temizliği büyük bir öneme sahiptir. Havalandırma ve dezenfeksiyona dikkat edilmesi<sup>11</sup>, tüleme zamanında temizliğin haftada bir<sup>12</sup>, rutin barınak temizliğinin iki-beş ayda bir<sup>13</sup>, genel barınak temizliğinin ise “*kar yağmadan temizlik yapılmaz*” inancı ile yılda bir kez karlı havada yapılması önerilir.<sup>14</sup> Barınakta salgın bir hastalık çıktığında kireç ile badana yapılır.<sup>15</sup> Güvercinleri hastalıktan korumak için barınağın zaman zaman kireç ile dezenfeksiyonu gerçekleştirilir, tabanı kuru tutulur<sup>16</sup> ve yaz aylarında kümese yabancı güvercin katılmaz.<sup>17</sup>

Bağ ve bahçelerde kullanılmak üzere<sup>18</sup> bölge halkı tarafından talep edilen<sup>19</sup> güvercin gübresi, özellikle barınak temizliği esnasında toplanır. Kullanılmadan önce asitliğinin giderilmesi için ortalama 8-10 gün sulandırılarak dinlendirilir<sup>20</sup> ya da bir yere yığılarak güneşte yanması sağlanır.<sup>21</sup>

Barınağın temizliğinde genellikle süpürge, fırça, kürek; zemini ve yuvalıkları kazımak için mala ya da spatula<sup>22</sup>; tüleme zamanı ise özellikle pürmüz<sup>23</sup> kullanılır. Zaman zaman barınak tabanına sönmüş kireç<sup>24</sup>, ozon<sup>25</sup> ya da sirke (%2)<sup>26</sup> dökülür, yuvalıklar hariç her yere kireç ile badana yapılır.<sup>27</sup>

Güvercinlerin tırnakları doğal ortamda kendi törpülenir, ancak kümeslerde barındırılan güvercinlerin uzayan gaga ve tırnakları tırnak makası yardımı ile kesilir.<sup>28</sup> Tırnak bakımı için haftada bir kez banyo sularına 1/5 oranında sirke veya ozon<sup>29</sup> ya da bir miktar (beş litre suya pirinç tanesi kadar) göztaşı<sup>30</sup>

katılır. Tırnaklarda dışıkların yapışması ile oluşan “*çakıldak*”lar, ıslatılıp yumuşadıktan sonra pense yardımı ile temizlenir.<sup>31</sup>

Konya ilinde halk arasında güvercinlerin tüy dökümü zamanına “*tülek*”, “*tüleme*” ya da “*tüleğe girme*”, tüy dökümüne giren güvercine ise “*tülekte, tüyde, tüleğe girmiş*” denir.<sup>32</sup> Tüleme zamanları, sağlıklı hayvanlarda görülen normal bir döngüdür. Bu zamanlarda içme sularına vitamin katılır.<sup>33</sup> Sık sık banyo suyu konulur<sup>34</sup> ve genellikle içerisine %1 oranında sirke<sup>35</sup>, ozon<sup>36</sup> veya göztaşı<sup>37</sup> katılır. Bu dönemde taze kanatlarının bozulmaması için güvercinler uçurulmaz.<sup>38</sup> Taze kanatlara halk arasında “*çabık*” adı verilir. Genellikle uçuş özelliği iyi olmayan ve tüleme zamanlarındaki güvercinler uçurulduğunda havada iken kanat patlatırlar (kanat altının yara olup kanaması).<sup>39</sup>

Kışın yavru alma Konya’da tercih edilmeyen bir durumdur. Dişilerin yavrulayıp bağışıklığının düşmemesi ve yavrunun soğuktan etkilenip ölmemesi için erkek ve dişiler genellikle ayrı bölmelere alınır.<sup>40</sup> Yavru alma planlanıyorsa barınak içi sıcaklığın dengeli (25-27 °C) olması, anaç güvercinlerin şeker ve karışık yem ile beslenmesi ancak önünde yemin sürekli bulundurulmaması gerekir.<sup>41</sup> Bazı yetiştiriciler iyi bakıldığı takdirde kış yavrusunun daha sağlıklı ve dinç olduğunu da ifade eder.<sup>42</sup>

### Besleme

Konya’da halk arasında karışık yeme “*çetnevir*” (Resim 2) denir.<sup>43</sup> Güvercinler genellikle arpa, aspir, ay çekirdeği, bamyaya, bezelye, buğday (sert), burçak, darı, fiğ (fıncık), kırmızı mercimek, mermer kırığı, mısır, mısır posası, palet yem, pirinç, süpürge tohumu, yulaf, yumurta kabuğu karışımı ile beslenir.<sup>44</sup>



Resim 2. Çetnevir<sup>45</sup>  
Figure 2. Çetnevir

Yavrunun yumurtadan çıkışı ile birlikte sağlıklı ve yeterli beslenebilmesi için anaç güvercinlere sabah ve akşam olmak üzere günde iki kez düzenli olarak çetnevir yedirilir.<sup>46</sup>

Anaç güvercinlerin yavrunun kursağı ve sindirim organlarını hazırlamak için boğazına ilk bir-iki gün hava üflemesine “*hava verme*” adı verilir.<sup>47</sup>

Kursaklarından çıkararak yavrunun kursağına kustukları besleyici kursak sütüne “*kusmuk*”, “*mayâ*”, “*mama*”, “*kuş sütü*”, “*kursak hamuru*” ya da “*hamurlama*” denir. Bu kursak içeriğini yavruya kustukları 10 günlük süreye ise “*hamurlama dönemi*” adı verilir.<sup>48</sup> Yavruya kusabilmeleri için yaklaşık beş-altı saat zaman geçmesi gerekir. Bu süre içerisinde kursak

içeriği yumuşar ve yavrunun beslenebileceği bir kıvam alır.<sup>49</sup>

Kursak sütü ile beslenen yavruya “*ağzı hamurlu*” denir.<sup>50</sup> Hamurlama döneminden sonra kendi kendine beslenebileceği olgunluğa erişene kadar anaç güvercinler yavruya yaklaşık 29-33 gün sürecince tane yem kusar.<sup>51</sup> Yavrunun yaklaşık 40-45 gün sonra kendi başına yem yemeye başlamasına “*yeme vurma*” adı verilir.<sup>52</sup>

Damızlık güvercinler genellikle çetnevir, uçum güvercinleri ise kızgınlığa gelmemesi ve yağlanma olmaması için sadece sert buğday ile beslenirler.<sup>53</sup> Gıda takviyesi olarak zaman zaman tuz veya şeker ile karıştırılan çay posası<sup>54</sup>, bağışıklığı ve sindirimi düzenlemesi için evde mayalanan yoğurt<sup>55</sup> yedirilir ya da kefir içirilir.<sup>56</sup> Üreme döneminde ise balık yağı takviye edilir<sup>57</sup>, eşe (çiftleşme) çabuk gelmesi için kızdırıcı yem (çiftleşmeye hazır hale getiren yem) ve ekmekek yedirilir<sup>58</sup> ya da suyuna şeker katılır.<sup>59</sup> Yavrulayan güvercinlere önünde devamlı bulundurulmamak kaydıyla çetnevir yedirilir<sup>60</sup> ve şekerli su içirilir.<sup>61</sup> Kuluçka döneminde kalsiyum, mineralli kum<sup>62</sup>, kırmızı kil ve mermer tozu yedirilir.<sup>63</sup> Tüleme zamanı güvercinlerin bağışıklığı düşük olduğu için antibiyotik kullanılmamaya dikkat edilir<sup>64</sup>, bu zamanlarda genellikle çetnevir yedirilir<sup>65</sup>, sirkeli su (5 lt su, 120 ml sirke)<sup>66</sup> ya da sirkeli ve tuzlu su karışımı (15 lt su, 120 ml sirke, 8 gr tuz) içirilir.<sup>67</sup>

Yazın çetnevir yerine<sup>68</sup> serin tutması için arpa<sup>69</sup>, fiğ<sup>70</sup> ve yeşillik<sup>71</sup>, kışın sıcak tutması için burçak<sup>72</sup> ve kenevir<sup>73</sup>, tüleme zamanı tüylerini rahat dökebilmesi için kenevir<sup>74</sup>, semiz otu<sup>75</sup>, zaman zaman ise semiz otu

ve tuz karışımı verilir.<sup>76</sup> Kızgınlığa gelmesi için burçak, fiğ ve kenevir tercih edilir. Kenevir aynı zamanda tüy renginin daha güzel ve canlı görünmesi için de tercih edilen bir yemdir.<sup>77</sup>

Uçum güvercinlerinde dört güvercine günlük ortalama 100 gr buğday<sup>78</sup>, damızlıklarda ise 10 güvercine günlük ortalama 350-500 gr yem kullanılır.<sup>79</sup> Disiplinleri ve sağlıkları için devamlı önünde yem bulundurmak yerine<sup>80</sup>, iyi performans sergileyebilmeleri için uçum güvercinleri çok doyurulmaz ve günün sadece akşam vakti beslenir.<sup>81</sup> Damızlıkların beslenmesi sabah ve akşam olmak üzere genellikle günde iki kez yapılırken<sup>82</sup>, bazı yetiştiriciler güvercinin önünde yemi sürekli bulundurmayı tercih eder.<sup>83</sup>

Yemler genellikle ağzı kapalı plastik kovalar<sup>84</sup>, büyük çömlekler (küp)<sup>85</sup>, tenekeler<sup>86</sup> içerisinde serin ve kuru yerlerde muhafaza edilir. Metal kovalar genellikle küflenme ihtimalinden dolayı tercih edilmez.<sup>87</sup>

Güvercinlere çoğunlukla şebeke suyu<sup>88</sup> içirilirken, bazı yetiştiriciler tarafından dinlendirilmiş kloruz su<sup>89</sup> verilir ve zaman zaman içme sularına %1 oranında sirke katılır.<sup>90</sup> Kloruzdan arınması için suyun içerisine göztaş eklenir. Ayrıca yetiştirici tarafından hazırlanan elektrolit adı verilen (beş lt su, iki tatlı kaşığı şeker, bir kaşık tuz, bir kaşık karbonat) karışımdan güvercinlere 15 günde bir içirilir.<sup>91</sup>

Suları günlük<sup>92</sup> ya da iki-üç günde bir<sup>93</sup> değiştirilir. Yarışmacı güvercinlerin suyuna vitamin ilave edilir.<sup>94</sup> Bayatlayan suyun hastalık yapacağı düşünüldüğü için kullanılan sulukların (Resim 3) büyük olmaması tavsiye edilir.<sup>95</sup>



**Resim 3.** Suluk ve yemlik<sup>96</sup>  
**Figure 3.** Drinker and feeder

### Üreme

Güvercinlerin cinsiyet tayini iki-altı aylık yaşta iken yapılır. Altı aydan önceki cinsiyet tayinleri ise büyük oranda tahmin yürütülerek gerçekleştirilir. Yavrunun çanağı (kalça kemikleri) küçük, kafası ve gövdesi iri, dөşü ve kanat telekleri geniş ise erkek olduğuna inanılır.<sup>97</sup>

Erkek ve dişi güvercinler üreme olgunluğuna ortalama beş-yedi aylık yaşta iken erişirler.<sup>98</sup> “*Arık*” ya da

“*yanık*” adı da verilen kötü bakılmış güvercinler ise kızgınlığa geç erişir.<sup>99</sup> Kızgınlık belirtileri gösteren güvercinler için “*eşe gelmiş*”<sup>100</sup>, “*eşleşmeye gelmiş*”<sup>101</sup>, “*kızana gelmiş*”<sup>102</sup>, “*kızmış*”<sup>103</sup> ifadeleri kullanılır. Dişilerde kızgınlık belirtileri erkek güvercinlere kıyasla daha erken görülür.<sup>104</sup>

Üreme dönemi erkek ve dişiler için genellikle şubat ayında başlar<sup>105</sup> ve temmuz ayına kadar devam eder. Temmuz ayından sonra ise tüleme başlar<sup>106</sup> ve bu



dönemde yavru alınmaz.<sup>107</sup> Ortam sıcak olduğu sürece üreme yıl boyunca devam eder.<sup>108</sup>

Bu dönemde erkek ve dişi güvercinlerde çeşitli kızgınlık belirtileri gözlenir. Erkeklerde göğüs tüylerini kabartma (gubarmak), yuvaya çöp taşıma<sup>109</sup>, ötme-nağme yapma (guğurmak)<sup>110</sup>, dişiyi kovalama<sup>111</sup>, sokulma<sup>112</sup>, kendi etrafında ve dişinin etrafında dönme<sup>113</sup>, dişilerde ise guğurma, kanat tüylerini kabartarak erkek güvercinin üzerine doğru yürüme (toslamak)<sup>114</sup>, kanat altı tüylerini kaşıma (kaşınma)<sup>115</sup>, yuvayı örme<sup>116</sup>, yuvayı ısıtma<sup>117</sup> gibi hareketler görülür.

Erkek güvercinin çiftleşmek için dişi güvercinin üzerine çıkmasına “*basmak*” denir.<sup>118</sup> Güvercinlerin çiftleşme, yumurta yapma dönemlerine ise “*badanas*” adı verilir. Erkek güvercinin, yumurtlama dönemi yaklaşmış dişi güvercini takip etmesine, kovalamasına “*badanasa binmek*”, “*ensed*” ya da “*enseye düşmek*” denir. Bu hareket ile badanas dönemi başlamış olur ve erkek dişiyi yumurtlayana kadar kovalar.<sup>119</sup> Badanas dönemi ile birlikte yaklaşık sekiz-on gün içerisinde yumurtalar döllendir<sup>120</sup> ve anaç güvercin ortalama 15 gün içinde yumurtlar.<sup>121</sup>



**Resim 4.** İçinde yuvalık bulunan eşleştirme kafesi<sup>132</sup>  
**Figure 4.** Matching cage with a nest in it

Güvercinin yumurtladığı döneme “*yumurta dönemi*”, yavru olduğu döneme ise “*yavru dönemi*” adı verilir.<sup>133</sup> Yumurtlama dönemi yaklaşan güvercinlere süpürge tohumu, yumurta kabuğu tozu, mermer tozu ve yeşillik yedirilir.<sup>134</sup>

Güvercinin yumurtlamasına “*gunnamak*”<sup>135</sup> denir ve tek seferde bir ya da iki yavru alınır.<sup>136</sup> Yedinci günden sonra kanlanma ve yavru oluşumunun gözlenmediği, içi boş olan güvercin yumurtasına “*çık*” adı verilir.<sup>137</sup> Yumurtlayacak güvercinin beli (kuyruküstü) düşer, güvercin kuyruğunu salar, arkası basık gezer, çatısı açılır ve kloakaya dokununca yumurta hissedilir<sup>138</sup>, bu güvercinlere “*yumurtayı almış*” ya da “*yüklü*” denir<sup>139</sup>. Güvercinlerde kloaka bölgesine halk arasında “*yumurtalık*”, “*çanak*”<sup>140</sup>, “*çatal*”, “*maka*”<sup>141</sup>, “*ka*”<sup>142</sup> ya da “*çati*”<sup>143</sup> gibi isimler verilir.

Eşleştirilecek güvercinlerin bir araya getirilmesine “*damızlığa çekme*” adı verilir.<sup>122</sup> Damızlık olarak seçilecek erkek ve dişi güvercinlerin; soy ağacı temiz, damarlı (uzak mesafelerden uçurulduğunda yuvasına geri dönebilen, kümesini benimseyen, yabancı yere inmeyen ve soyu belli olan güvercin),<sup>123</sup> taklacı güvercinlerde oyun yapma özelliği iyi, süs güvercinlerinde fiziksel yapının güzel olması istenir.<sup>124</sup> Erkek ve dişilerin damızlık özellikleri genellikle göz ve kafa yapısından anlaşılır.<sup>125</sup>

Belirli bir renk ya da ırk özelliğini korumak için gerçekleştirilecek özel eşleştirmelere “*eşe atma*” denir.<sup>126</sup> Bu eşleştirmelerde güvercinler birbirlerine alışmaları ve diğer güvercinler tarafından rahatsız edilmemeleri için içerisinde yuvalık bulunan “*eşhané*” ya da “*eşleştirme kafesi*” (Resim 4) adı verilen yuvalara alınır.<sup>127</sup> Güvercinler bu bölmelerde yaklaşık 15 gün bir arada tutulurlar.<sup>128</sup> Ortamın aydınlık ve güneş görmesi güvercinlerin strese girmemeleri için önemli bir koşuldur.<sup>129</sup> Salık güvercinler ise eşini kendisi bulur<sup>130</sup> ve bu duruma “*eş tutma*” denir.<sup>131</sup>

Kuluçkaya yatmayan güvercinlerin yumurtaları “*bakıcı*” adı verilen kısır güvercinlerin altına ya da “*üvey anne*” olarak tanımlanan eş zamanlı yumurtlayan başka bir güvercinin altına konulur. Bu duruma “*yumurta sürmek*” adı verilir.<sup>144</sup> Bakıcı olarak genellikle posta güvercinleri tercih edilir.<sup>145</sup>

Yavrunun yumurtadan çıkmasına üç-dört gün kalması ile anaç güvercinlerin kursak içeriğinin süt gibi besleyici bir form alması, hamurlaşmasına “*hamurlamak*” adı verilir. Bu durum yavrunun bir müddet sonra yumurtadan çıkacağına işaret eder.<sup>146</sup> Erkek anaç güvercinler dişi anaç güvercinlere kıyasla kuluçkaya daha az süre yatar ancak yavru ile daha fazla ilgilenirler. Yaklaşık 40 günden sonra dişi güvercinin tekrar yumurtladığı durumlarda yavruları genellikle erkek güvercinler büyütürler.<sup>147</sup> Ebeveynleri tarafından bakılmayan yavrular ise beslenme pompası yardımı ile beslenir.<sup>148</sup>

## TARTIŞMA ve SONUÇ

Hayvan yetiştiriciliğinde temel hijyen ve biyogüvenlik kurallarına dikkat edilmesi bakteri, virüs, mantar, paraziter hastalıklar ve muhtemel bir salgını sınırlandırarak sağlık ve verimliliği artırmakta, tedavi masraflarını ve hastalığın zararını azaltmakta, hayvan kayıplarını önlemekte ve böylece karlılığı artırmaktadır. Bu sebeple karantina ile birlikte etkili ve sürekli temizlik yapılmalıdır (Sarı ve Saatci 2020). Başarılı bir güvercin yetiştiriciliği için, en uygun yetiştirme şartlarının sağlanması, dolayısıyla barınaklarının iyi planlanması, barınak içerisinde gerekli donanımların sağlanması, ışık, sıcaklık, nem, havalandırma gibi hayati öneme sahip faktörlerin ve hijyenin korunması, ayrıca hijyeni korumaya yönelik tedbirler alınması, çıkması muhtemel hastalıkların önlenmesi adına önemli hususlardandır (Yılmaz ve ark. 2012). Çalışmada da barınakların, tüleme zamanında rutin ve genel temizliğinin gerçekleştirilmesi, havalandırma ve dezenfeksiyonuna dikkat edilmesi, salgın bir hastalık çıktığında kireç ile badana edilmesi ve zemininin kuru tutulması yukarıdaki çalışmalara benzer olarak hayvan gönencine (refahına) ve koruyucu hekimliğine önem verildiğinin bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Yaz aylarında yetiştiricilerin kümese yabancı güvercin katmayarak özellikle salgın hastalıklara karşı tedbir aldıkları ve bu sayede muhtemel hastalıklara karşı sürü sağlığını korudukları da söylenebilir.

Güvercinlerin özel kümeslerde (ortalama 2x2 ya da 1,5x2 m genişliğinde ve 1,5-1,80 m yüksekliğinde) yetiştirilmesi, kümeslerin çoğunlukla toprak kerpiçten yapılmış olması gerektiği ifade edilirken (Özmen 1981); Çalışmada da Özmen'in verileri ile benzer olarak kümeslerin (Resim 1) genellikle güvercinlerin sayısına ve özelliklerine göre farklı şekillerde dizayn edilmesi (Resim 4), taklacı güvercinlerde damızlık ve uçum kümeslerinin ayrı olması, ana ve babanın damızlık, yavruların ise uçum kümesine alınması, uçum kümeslerinin 2x2x2 m olmasına dikkat edilmesi, damızlık güvercinlerin geniş ve aydınlık, süs güvercinlerinin ise tüy yapısının sağlıklı olması açısından geniş kümeslerde yetiştirilmesi ve kümeslerin yapımında çoğunlukla kerpiç tercih edilmesi; Konya ilinde güvercin yetiştiriciliğine ait folklorik verilerin günümüzde de devam ettiği, çoğunlukla hobi amacıyla yetiştiricilik yapılmasına rağmen barınak hususunda gösterilen hassasiyetin aynı zamanda hayvan gönencine verilen önemin de bir göstergesi olduğu söylenebilir.

Yılmaz ve Boz'un (2012) Sarıca'dan aktardıklarına göre, Türkiye'de genellikle hobi amaçlı güvercin üretim birimleri ve evlerin çatılarında gübreleri için yetiştiricilik dışında ticari bir üretim şekli bulunmamaktadır. Çalışmada, güvercinlerin bakımı için günlük en az iki saat, eğitimleri için yaklaşık üç-beş saat zaman ayrılması, yarışmalara hazırlanan güvercinlerin en az bir ya da bir buçuk senelik eğitim

periyodundan geçirilmesi için harcanan çaba ve zahmet dikkate alındığında elde edilen verilerin Yılmaz ve Boz'un aktardıkları ile uyumlu olduğu, dolayısıyla güvercin yetiştiriciliğinin daha çok hobi amaçlı yapıldığı sonucuna varılabilir.

Özmen'e (1981) göre, Konya'da güvercin gübresinin, daha çok çiçekler ve sebzelerde, nadiren de ağaçlarda kullanıldığı bildirilmektedir. Bu çalışmada da asitliği giderilmiş ve güneşte bekletilmiş güvercin gübresinin sebze ve meyve yetiştiriciliğinde tercih edilmesi, Konya'da bahçecilikte gübrenin kontrollü ve bilinçli bir şekilde kullanıldığı şeklinde yorumlanabilir.

Yılmaz ve ark.'a (2012) göre, güvercin yetiştiriciliğinde dengeli bir rasyon hazırlanması ideal bir besleme yapmak için oldukça önem arz etmektedir. Enerji kaynağı olan hububatlar, protein kaynağı olan baklagiller ve endüstri bitkisi posaları ile kepek, mermer tozu, tuz, vitamin ve mineral gibi diğer öğeler dengeli bir oranda rasyona katılması ile güvercin yetiştiriciliğinde yaşanan birçok problem büyük oranda giderilebilir. Çalışmada elde edilen, damızlık güvercinlerin çetnevir (Resim 2), uçum güvercinlerinin sert buğday ile beslendiği, gıda takviyesi olarak tuzlu yada şekerli çay posası, bağışıklığı ve sindirimi düzenlemesi için yoğurt ya da kefir, üreme döneminde balık yağı, kuluçka döneminde mineralli kum, kırmızı kil ve mermer tozu takviye edildiği bulgularından hareketle Konya'da da güvercinlerin gıda takviyesi, bağışıklık, sindirim düzenleyici ve üreme dönemi ihtiyaçlarının dikkate alınarak rasyonlar hazırlandığı ve günümüz rasyonel beslenme yöntemlerine uygun olduğu belirtilebilir.

Konya ilinde gerçekleştirilen bir araştırmada güvercinlerin, sert buğday, küçük mısır, burçak, fiğ ve arpa ile kışın ise çoğunlukla burçak ile beslendiği (Özmen 1981); İç Anadolu Bölgesi Konya Bölümünde gerçekleştirilen benzeri bir araştırmada güvercinlere sabah akşam olmak üzere buğday, fiğ, mercimek yedirildiği (Yaşar ve ark. 2013); genel olarak kış beslemesinde arpa, buğday, mısır, fasulye, burçak ve bezelye önerildiği (Alataş 2017); Çalışmada ise güvercinlerin genellikle yukarıdaki literatürlerde belirtilen taneli yemleri de içeren çetnevir ile beslendiği ancak damızlık ve uçum güvercinlerinde, kuluçka dönemi, üreme dönemi ve tüleme zamanlarında farklı rasyonlar uygulandığı; özellikle kış aylarında burçak yedirilmesi verilerinin, Özmen (1981) ve Alataş'ın (2017) çalışma verileri ile uygunluk gösterdiği söylenebilir. Dolayısıyla rasyon hazırlanırken güvercinlerin fiziksel ihtiyaçları ve performanslarının dikkate alındığı, mevsim şartlarına uygun bilinçli bir beslenme programı uygulandığı ve tercih edilen yem maddelerinin yetiştiriciler tarafından iyi bilindiği ileri sürülebilir.

Hastalıkların tedavisinde kullanılan tuzun bakteri, mantar ve sülüklere karşı etkili olduğu, bazı parazitlere karşı da etkili olabileceği; sirkenin ise çok eski yıllardan beri kullanılmakta olduğu ve özellikle dezenfeksiyonda yaygın olarak tercih edildiği (Kanlı 2018); sirkenin doğal bir antibiyotik ve iyi bir



antiseptik olup, vücutta zararlı bakterileri ortadan kaldırdığı, bağırsak florasındaki yararlı bakterilerin gelişimini desteklediği ve içerdiği C vitamini ve diğer besin değerleri sayesinde vücut direncinin artmasına katkı sağladığı (Gürol Ekinci 2017); kanatlı hayvanlarda mikotik etkenlerden kaynaklanan kursak problemlerini çözmek için kanatlıların içme sularına litreye 15 ml karıştırılarak Kandidiazis olgularında kullanıldığı (Polat 2019); tüleme dönemlerinde elma sirkesi ve sofr tuzu karışımları ile banyo yaptırılabilceği (Garip 2017); Çalışmada ise yukarıdaki literatür verilerine paralel olarak tüleme zamanında antibiyotik kullanılmamaya dikkat edildiği, sirkeli su ya da sirkeli ve tuzlu su karışımı içirildiği, bu doğrultuda Konya ili güvercin yetiştiricilerinin bu konudaki bilgisinin derin olduğu, halk hekimliğinde sirkenin bağışıklık üzerindeki etkisinden uzun zamandır faydalanılarak rasyonel tedavi yöntemlerinin uygulandığı sonucuna varılabilir.

Ozonun sudaki total organik karbon oranını %15'lere kadar azaltabildiği, sudaki nitrit düzeyi ile suyun bulanıklığını azalttığı ve sudaki katı maddelerin oksidasyonunu sağlayarak uzaklaştırdığı, artan konsantrasyonuna bağlı olarak sudaki kimyasal oksijen tüketimi ile total organik karbon oranları ve renk değişimi (berraklık) oranlarının oldukça verimli olduğu (Kanlı 2018); özellikle tavuklarda ayda bir olmak üzere içme sularına göztaşı ilave edilmesi gerektiği (Çetinkaya ve ark. 2013); ayrıca hastalık etkenleri ile bulaşmış yerlerin dezenfeksiyonu için göztaşı kullanıldığı (Aydın 1984); hava koşullarının elverişli olduğu durumlarda haftada bir veya iki kez banyo suyu konulması gerektiği (Garip 2017); yukarıda belirtilen literatür verilerine paralel olarak, Çalışmada da tüleme zamanlarında banyo sularına %1 oranında sirke, ozon veya göztaşı ilave edilmesinin geçmişten günümüze hala kullanılmakta olan göztaşı ve bu kapsamda tercih edilen sirke ve ozon kullanımına ilişkin geleneksel halk kültürünün halen devam ettiği şeklinde değerlendirilebilir.

Konya ilinde gerçekleştirilen bir çalışmada, erkek güvercinin dişi güvercinin peşine düştüğü, çiftleşme, yumurta yapma dönemine "badanas", ötmesine "guğurmak", dişi güvercinin kanatlarını gererek erkek güvercinin üzerine doğru yürümesine "toslamak", hiç gelişmeden bozulan yumurtaya "calk", ayrıca kendi yuvasından başka yuvaya gitmeyen güvercine "damarlı", güvercinin eski tüylerini atıp yeni tüyler çıkarmasına "tüleme" denildiği (Özmen 1981); Çalışmada da "badanas", "guğurmak", "toslamak", "calk", "damarlı" ve "tüleme" kelimelerinin Konya'da hala aynı anlamlarda kullanıldığı dolayısıyla bu durum bölgesel terimlerin geleneksel halk kültüründe varlığını devam ettirdiğinin bir işareti olarak belirtilebilir.

Güvercinler bir seferde yalnızca iki yumurta bıraksalar da tek bir çift, yılda elli güvercin üretebilir. Güvercinlere özgü en etkileyici özelliklerden biri her iki ebeveynin "güvercin sütü" salgılayan salgı bezlerine sahip olmasıdır (Allen 2009). Yavrular bir haftalık

yaşlarını tamamladıktan sonra ebeveynlerinin kursak içeriği yavaş yavaş tane yem içeriğine doğru bir değişim gösterir (Garip 2017). Her ikisi de yavrularını 35-37 gün bu maddeyle besler (Allen 2009). Anaç güvercinlerin hava verme döneminden çıkmış yavruların boğazına, kursaklarından çıkardıkları süte benzer, hamur halindeki besleyici sıvıyı kusmasına Konya ilinde "hamurlama" adı verildiği, bu sıvının yavrunun yumurtadan çıkmasına iki-üç gün kala anaç güvercinlerin kursağında toplandığı bildirilir (Özmen 1981). Çalışmada da literatüre paralel olarak benzer sayıda yavru alındığı; anaç güvercinlerin kursak içeriğinin hamurlaştığı ve yaklaşık 40-45 gün sonra kendi başına yem yemeye başladığının belirtilmesi, yetiştiricilerin gözlem ve analizlerinin rasyonel ve günümüz bilimsel verileri ile (Allen 2009) çok benzer olduğuna; ayrıca Özmen'in çalışmasında ifade edilen "hamurlama" kelimesinin Konya'da hala benzer şekilde kullanılıyor olması, güvercin yetiştiriciliğine ait terimlerin bölgede varlığını devam ettirdiğine ve geleneksel halk kültürünün canlı kaldığına kanıt olarak gösterilebilir.

Sonuç olarak; Konya ili geleneksel halk kültüründe güvercin yetiştiriciliğine ilişkin folklor bilgisinin zengin olduğu ve folklorik veteriner hekimliği literatürüne ve Türk halkbilimine katkı sağlayacağı, elde edilen verilerin bilimsel veriler ile genel olarak uyumlu ve rasyonel nitelik taşıdığı ileri sürülebilir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

**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.

**Teşekkür:** Bilimsel iş birliği ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Mustafa Garip'e teşekkür ederiz.

**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 "Yetiştiricilik, Bakım, Besleme ve Üreme" kısmı genişletilerek hazırlandı.

## KAYNAKLAR

- Alataş MS.** Besleme, In: Güvercin El Kitabı, Ed; Işık N, Er A, Güneş Tıp Kitabevleri, Ayrıntı Basım Yayın ve Matbaacılık, Ankara. 2017; s. 41-54.
- Allen B.** Pigeon or Dove, In: Pigeon, Ed; Burt J, Published Reaktion Books Ltd, London, UK, 2009; pp. 17-56.
- Aydın N.** Bölge tavukçuluğunu etkileyen hastalık sorunları ve alınması gerekli hijyenik önlemler. Selçuk Üniversitesi Vet. Fak. Derg. 1984; Özel Sayı: 77- 90.
- Bekleyen A.** Diyarbakır kırsalındaki güvercin evleri: Boranhaneler, Karaçalı (Tilalo) Köyü. Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Derg. 2007; 8(2):99-107.

- Çetinkaya M, Göç V, Karamık Ş.** Yumurta tavuğu ve etlik piliç yetiştiriciliği. 9. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi, 23 – 25 Mayıs 2013, Erzurum.
- Garip M.** Yetiştiricilik, In: Güvercin El Kitabı, Ed; Işık N, Er A, Güneş Tıp Kitabevleri, Ayrıntı Basım Yayın ve Matbaacılık, Ankara. 2017; s. 1-41.
- Gürol Ekinci M.** Doğal antibiyotikler. Ayrıntı Dergisi. 2017; 5(55):5-8.
- Kanlı E.** Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) yumurtalarında alternatif dezenfeksiyon uygulamaları. Doktora Tezi, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü/Su Ürünleri Anabilim Dalı, Rize, 2018.
- Özen R.** Bird shelters in Turkey: Birdhouses and Dovecotes. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2012; 18(6):1079-1082.
- Özkul T, Yerlikaya H.** Tarih boyunca savaşlarda hayvan kullanımından örnekler. Veteriner Hekimler Derneği Derg. 2008; 79(1):31-38.
- Özmen M.** Konya’da güvercinlik. Selçuk Üniversitesi Edebiyat Fakültesi Derg. 1981; 1, 157-187.
- Polat E.** Bir güvercinde kursak nekrozu ve operatif tedavisi. Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Derg. 2019; 8(1):120-123.
- Sales J, Janssens GPJ.** Nutrition of the domestic pigeon (*Columba livia domestica*). World’s Poultry Science Journal. 2003; 59(2): 221-232.
- Sarı M, Saatçı M.** Biosecurity procedures with the all aspects in goose breeding. Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology. 2020; 8(1):35-41.
- Yaşar A, Çelik E, Aslım G.** Pigeon in Konya province folklore: 1. Diseases and their treatments. Kocatepe Vet J. 2021;14(1):26-36.
- 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.
- Yılmaz O, Boz MA.** Türkiye’de amatör güvercin yetiştiriciliğinin durumu ve kullanılan yöresel tip sınıflandırmaları. Akademik Ziraat Derg. 2012; 1(1):45-60.
- Yılmaz O, Ertürk YE, Coşkun F, Ertuğrul M.** Güvercinin (*Columba livia* Gmelin, 1789) ekonomik önemi. Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Derg. 2014; 3(2):199-207.
- Yılmaz O, Savaş T, Ertuğrul M.** Batman, Diyarbakır, Mardin ve Şanlıurfa illerinde güvercin yetiştiriciliği kültürü, kimi sorunlar ve çözüm önerileri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Derg. 2012; 16(1):49-53.

## Sonnot

- 1 K1-3,5,8-17,19-28  
2 K9-11,14-17,19-21,23-28  
3 K10-11,14,23-26  
4 K10,12-13  
5 K15-17,19  
6 K14,23-26  
7 K9  
8 K1,6,8-17,19-21,27-28  
9 K4  
10 K1  
11 K15-17,19,22  
12 K14,16-17,19,21  
13 K8,12-13,15-17,23-28  
14 K9-11,14-15,20-21,23-28  
15 K14  
16 K27-28  
17 K23-26  
18 K1-3,5,9-28  
19 K1-3,8,14-17,19  
20 K9-10,15,20-21,23-28  
21 K28  
22 K1,2,4,9-17,19,22-28  
23 K8,12,14,24-28

- 24 K1,4,6,12-13,22,27-28  
25 K2,6,8,12-13,25-28  
26 K22-27  
27 K9-11,13,23-28  
28 K12-17,19-28  
29 K1,6,9-12,15-17,19  
30 K1,11  
31 K9-17,19-21,23-28  
32 K1,4-5,9-14,21,23-28  
33 K1,27-28  
34 K1,9,12-17,19-21,23-28  
35 K1-2,12,14,20-21,23-26  
36 K14-17,19-21,23-26  
37 K16-17,19-20  
38 K15-17,19  
39 K1  
40 K4,8-12,14-17,19  
41 K1,20-21,23-28  
42 K4-5,20-21  
43 K23-26  
44 K1,8-13,15-17,19-28  
45 K20  
46 K1,9  
47 K1,3,9-11,15-17,19,23-26  
48 K1,3-6,8-17,19-28  
49 K1  
50 K20-21  
51 K1,3,8-13,15-17,19-21,23-28  
52 K1,5-6,8-11,15-17,19,23-28  
53 K1,9-11,14-17,19  
54 K21,23-26  
55 K11  
56 K8  
57 K8  
58 K23-26  
59 K21  
60 K9-11,14-17,19-21  
61 K21  
62 K27-28  
63 K4,6  
64 K8  
65 K14,23-28  
66 K12,21,28  
67 K27  
68 K14  
69 K1,15-17,19  
70 K27-28  
71 K8,27-28  
72 K27-28  
73 K14  
74 K11  
75 K8-9,27-28  
76 K14  
77 K23-26  
78 K1  
79 K1,9-11,14-17,19  
80 K14  
81 K1,15-17,19,23,25-26  
82 K1,8-17,19-21,27-28  
83 K22-26  
84 K8-11,13-15,20-21,27-28  
85 K27  
86 K12  
87 K9,11  
88 K4,9,12-17,19,21,23,26-28  
89 K1,10-11,14,20,24-25  
90 K4,6,14  
91 K20  
92 K4,8-11,16-17,19-22,25  
93 K1,6,12-15,23-24,26-28  
94 K4,22  
95 K9-11  
96 K1  
97 K4-6,8,12-17,19,22-28  
98 K1,4-6,9-17,19-21,23-28  
99 K23-26  
100 K1,4-6,9-10,12-17,19-28  
101 K5,14-17,19,22  
102 K1  
103 K8-17,19-21,23-28  
104 K8  
105 K1,4-5,8-17,19,23-28  
106 K1,8,15-17,19,27-28  
107 K12-13,27-28  
108 K4,6,9-17,19-28  
109 K1,8-17,19-28  
110 K1,4,8-17,19-21,23-28  
111 K4,8,14-17,19-21,23-26  
112 K4  
113 K5,11,14,20-26  
114 K1,5,8-11,14-17,19-21,23-28  
115 K1  
116 K1,14,23-26  
117 K9-14,20-21  
118 K12-13  
119 K1,5-6,8-17,19-21,23-28  
120 K8,27-28  
121 K9-11  
122 K6  
123 K1,8-13,20-21,23-28  
124 K1,4-5,8-17,19-28  
125 K3,9-14  
126 K12-13  
127 K1,3,6,8-17,19-21,23-28  
128 K1,4,9-11  
129 K1,4,23-26  
130 K6,8-14,27-28  
131 K9,11-13

---

132 K1  
133 K15-17,19  
134 K1  
135 K1  
136 K1,3-6,8-17,19-28  
137 K1,9-11,20-21  
138 K1,5-6,8-17,19-22,24-28  
139 K12-13,20-21,24-25,27-28  
140 K1,4-6  
141 K9-11  
142 K12-17,19-21,23-28  
143 K5,8,22  
144 K1,4-5,7-17,19-21,23-28  
145 K12-14,23-28  
146 K1,8,12-13,20-21,27-28  
147 K3-5,9-11  
148 K12,14,23-26

## Investigation of the Effect of Zingerone on Some Biochemical Parameters on Cisplatin-Induced Liver Toxicity in Rats

Amdia MAHAMADU<sup>1</sup> Fatih Mehmet KANDEMİR<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Atatürk University, 25240 Erzurum, Turkey

### ABSTRACT

This study was aimed to investigate the protective effects of zingerone (ZO) on cisplatin (CP)-induced hepatotoxicity in rats. Thirty-five (35) Sprague Dawley male rats were used in the study; the animals were divided into 5 groups of 7 rats in each group. Group 1 (Control): received only oral serum physiologic (SP, for 7 days). Group 2 (CP): received a single dose of 7 mg/kg intraperitoneal (i.p.) of CP. Group 3 (ZO): Received daily oral doses of ZO at 50 mg/kg/day for 7 days. Group 4 (CP+ZO 25): Oral administration of ZO at 25 mg/kg/day was started 30 minutes after a single dose CP application and continued for 7 days. Group 5 (CP+ZO 50): Oral administration of ZO at 50 mg/kg/day was started 30 minutes after a single dose CP application and continued for 7 days. Alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase (ALP) activities increased due to CP administration. Also, enzymatic antioxidants; superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT) and glutathione (GSH) level were shown to had decreased upon CP administration. After ZO was supported by antioxidant system and decreased malondialdehyde (MDA) levels. It was determined that CP administration increased nitric oxide (NO), 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), cysteine aspartate specific protease-3 (caspase-3), tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and B-cell lymphoma-3 (Bcl-3) levels while arginase activity reduced, ZO administrations could have been the main cause of the improved effects on the parameters.

**Keywords:** Cisplatin, Hepatotoxicity, Inflammation, Oxidative stress, Zingerone.

\*\*\*

## Sisplatin ile Karaciğer Toksisitesi Geliştirilen Ratlarda Zingeron'un Bazı Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisinin Araştırılması

### ÖZ

Bu çalışmada, ratlarda sisplatin (SP) kaynaklı hepatotoksisite üzerine zingeron' un (ZO) etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmada 35 adet Sprague Dawley erkek rat kullanıldı. Hayvanlar, her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. 1.Grup (Kontrol): Sadece oral serum fizyolojik (SF, 7 gün) verildi. 2. Grup (SP): Tek doz 7 mg/kg SP periton içi (i.p.) uygulandı. 3.Grup (ZO): ZO 7 gün boyunca 50 mg/kg/gün dozunda oral verildi. 4. Grup (SP+ZO 25): Tek doz SP uygulamasından 30 dk sonra 25 mg/kg/gün dozunda ZO verilmeye başlandı ve 7 gün devam etti. 5.Grup (SP+ZO 50): Tek doz SP uygulamasından 30 dk sonra 50 mg/kg/gün dozunda ZO verildi ve 7 gün devam etti. Alanin transaminaz (ALT), aspartat transaminaz (AST) ve alkalin fosfataz (ALP) aktivitelerinin SP uygulaması ile arttığı, antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (KAT) aktiviteleri ile non-enzimatik antioksidan olan redükte glutatyon (GSH) seviyelerinin SP grubunda düştüğü, malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığı görülmüş, ZO' un ise antioksidan sistemi desteklediği ve MDA düzeylerini azalttığı gözlenmiştir. SP uygulamasının arginaz aktivitesini düşürürken nitrik oksit (NO), 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), sistein aspartat spesifik proteaz-3 (kaspaz-3), tümör nekroz faktör-alfa (TNF- $\alpha$ ), nükleer faktör kappa B (NF- $\kappa$ B) ve B-hücreli lenfoma-3 (Bcl-3) seviyelerini artırdığı, ZO' un bu parametrelerde iyileşme sağladığı saptandı.

**Anahtar Kelimeler:** Hepatotoksisite, İnflamasyon, Oksidatif stres, Sisplatin, Zingeron

To cite this article: Mahamadu A. Kandemir F.M. Investigation of the Effect of Zingerone on Some Biochemical Parameters on Cisplatin-Induced Liver Toxicity in Rats Vet J. (2021) 14(3):325-338

Submission: 20.05.2021 Accepted: 18.07.2021 Published Online: 02.09.2021

ORCID ID: AM: 0000-0002-6748-3487, FMK: 0000-0002-8490-2479

\*Corresponding author e-mail: fmechmet.kandemir@atauni.edu.tr

Günümüzde kanser vakalarının artması birçok tedavi yöntemlerini de beraberinde getirmiş ve bu yöntemlerle hastalar iyileştirilmeye ya da yaşam süreleri artırılmaya çalışılmıştır. Kemoterapötik ajanların keşfedilmesi kanser tedavisi için yeni bir kapı açmış, çeşitli kemoterapötikler tedavi amacı ile kullanılmaya başlamıştır. Bu amaçla kullanılan ilaçların başında güçlü bir kemoterapötik olan SP gelmektedir (Koc ve ark. 2015, Kandemir ve ark. 2019). Çoğu kemoterapötiklerde olduğu gibi SP' in de antineoplastik etkisine rağmen, klinik kullanımını sınırlayan ciddi toksik yan etkileri vardır. Kemoterapötiklerin kullanımından sonra ortaya çıkabilecek yan etkilerden bazıları; ototoksisite, nefrotoksisite ve nörotoksisitedir (Cayin ve ark. 2015). SP' in antitümör etkisinin, DNA iplikçiklerinin çapraz bağlanmasına yol açması ve DNA ile birlikte eklenme yeteneğinin bir sonucu olduğu bildirilmiştir (Kandemir ve ark 2019). Çeşitli tümör veya malignite için kemoterapötik olarak kullanılan SP' in düşük dozlarda görülmesede, yüksek dozlarda verildiğinde hepatotoksisiteye neden olabileceği rapor edilmiştir (Cure ve ark. 2016).

SP' in neden olduğu hepatotoksisitenin temel nedeninin artan reaktif oksijen türlerinden kaynaklanan oksidatif stres olduğu bildirilmiştir. SP kaynaklı hepatotoksisite, oksidatif stres mekanizması ile gerçekleşir ve SP' in ilk hedefi mitokondriylerdir. Mitokondriyal protein-SH' nin tükenmesine yol açan, dolayısıyla kalsiyum akışını ve daha sonra mitokondriyal membran potansiyelini azaltan SP bu yolla oksidatif stres gelişimini hızlandırır (Saad ve ark. 2004).

Sentetik ilaçlar bulunmadan önce tedavi için yaygın olarak tıbbi bitkiler kullanılırdı. Günümüzde de reçetelerin yaklaşık % 40' ı halen tıbbi bitkiler içermektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılında yaptığı çalışmaya göre, dünya nüfusunun %80' inden fazlası temel sağlık hizmetlerinde bitki özleri veya bitkisel bileşenleri kullanmaktadır. Satın alınabilirliği, kolay temin edilebilirliği ve yan etkilerinin azlığı nedeniyle kimyasal ilaçların yerine bitkilerin kullanımına yönelik talep giderek artmaktadır. Zencefil tedavide en yaygın kullanılan çeşnilerden biri olarak bilinir. (Grover ve ark. 2002, Bilal ve ark. 2015).

Yapılan literatür taramalarında zingeron, shogaol ve paradol' ün zencefilde en yaygın şekilde bulunan etken maddeler olduğu tespit edilmiştir. ZO (4- (4-hidroksi-3-metoksifenil) -2-bütanon) birçok farmakolojik özellik gösteren etkili ve ucuz bir bileşendir (Bilal ve ark. 2015). Aynı zamanda ZO' un toksik olmadığı ve süperoksit radikallerini temizlediği belirtilmiştir (Kandemir ve ark. 2019).

Mevcut çalışmada SP' in oluşturduğu karaciğer toksisitesine karşı ZO' un etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

### Deney Hayvanları

Bu çalışmada Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi' nde (ATADEM) üretilen 250-300 g ağırlığındaki otuz beş adet Sprague Dawley cinsi erkek rat kullanıldı. Deneyde kullanılacak olan ratlar uygulamadan 7 gün önce tartılarak seçildi ve ortama adaptasyonu sağlandı. Gruplara ayrılan ratlara yem ve su ad libitum verildi. Ortam şartları  $24 \pm 1$  °C ve  $45 \pm 5\%$  nem oranına, 12 saat aydınlık/karanlık döngüsüne sahipti. Çalışma, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı' nın 26.11.2017 tarihli (toplantı sayısı: 11) ve karar no:133 izni ile belgelendirildi.

### Çalışmada Kullanılan İlaçlar

Çalışmamızda kullanılan SP, Koçak Farma' dan (cisplatin 50 mg/100 ml flakon) temin edildi ve 7 mg/kg/i.p. tek doz verildi. Uygulanan doz seçiminde daha önce yapılmış olan çalışmalardan yararlandı (Kandemir ve ark 2019). ZO (Vanillyl Aseton) ise Sigma-Aldrich (katalog no: W312401) firmasından temin edilerek 25 mg ve 50 mg' lik 2 dozda hazırlanıp oral olarak verildi (Kandemir ve ark. 2019).

Analizlerde kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıkta olup Sigma-Aldrich' den (St-Louis, Missouri, ABD) alındı.

### Deneysel Uygulamalar

Tüm ratlar her grupta 7 rat olacak şekilde 5 gruba ayrıldı.

1. Grup: Kontrol; Hiçbir ilaç uygulaması yapılmadı, sadece oral olarak SF verildi.
2. Grup: SP; Karaciğer hasarı sağlamak üzere 7 mg/kg/i.p. SP tek doz uygulandı.
3. Grup: ZO; ZO, 50 mg/kg dozunda 7 gün oral olarak verildi.
4. Grup: SP+ZO25; SP 7 mg/kg/i.p. tek doz verildikten 30 dk sonra 25 mg/kg ZO oral olarak 7 gün verildi.
5. Grup: SP+ZO50; SP 7 mg/kg i.p. tek doz verildikten 30 dk sonra 50 mg/kg ZO oral olarak 7 gün verildi.

### Deney Sonunda Numunelerin Alınması

Son ZO uygulamasından 24 saat sonra (8. gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi (Sevorane sıvı %100; Abbott Laboratory, İstanbul, Türkiye) altında dekapite edildi. Antikoagülantsız tüplere alına kanlar  $+4$  °C, 3000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Karaciğer dokuları, üzerindeki kan ve pıhtıdan ayrıldıktan sonra biyokimyasal analizler yapılmaya kadar  $-20$  °C' de muhafaza edildi.

### Serum Biyokimyasal Parametrelerinin Analizi

Serum AST, ALP ve ALT aktiviteleri ticari kitler ile (TML, Tamı Medikal Ürünler, Ankara, Türkiye) ölçüldü.

### Karaciğer Biyokimyasal Parametrelerinin Analizi

Karaciğer homojenatında MDA düzeyleri Placer ve ark. (1966), GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay (1968), GPx aktivitesi Matkovics ve ark. (1988), SOD aktivitesi Sun ve ark. (1988), KAT aktivitesi Aebi ve ark. (1983) metoduna göre ölçüldü. Homojenat protein miktarının tayininde Lowry ve ark. (1951) metodu kullanıldı. Karaciğer arginaz aktivitesi tiyosemikarbazid-diasetil monoksim üre (TDMU) yöntemi modifiye edilerek tespit edildi (Geyer ve Dabich 1971).

Karaciğer dokusu Bcl-3, 8-OHdG, kaspaz-3, TNF- $\alpha$  ve NF- $\kappa$ B seviyelerinin ölçümü sandviç ELİSA kitleri (yl biont, Shangai, China), NO düzeyleri ise

kolorimetrik ticari kit (Enzo Life Sciences, Lausen, Sweden) ile üretici protokolüne göre yapıldı.

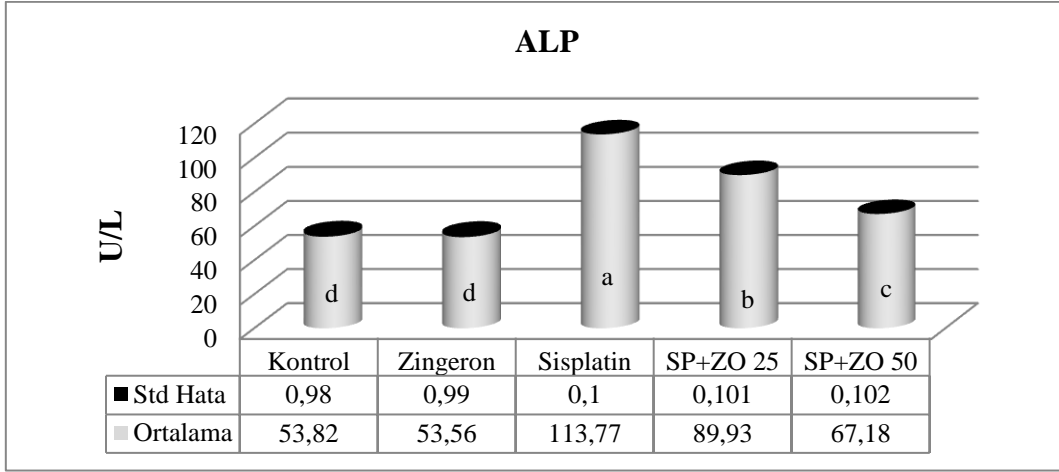
### BULGULAR

#### Biyokimyasal Bulgular

Ratlarda SP kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerine ZO' un etkilerini araştırdığımız bu çalışmada, şekillerdeki aynı harfler sütunlar arasında istatistiksel fark olmadığını ( $P>0.05$ ), farklı harfler istatistiksel farkı gösterir ( $P<0.05$ ).

#### 1. Serum ALP Aktivitesi

Serum ALP aktiviteleri incelendiğinde (Şekil 1) kontrol ile ZO grupları arasında herhangi bir fark olmadığı ( $P>0.05$ ) ve kontrol grubuna göre SP grubunda ALP aktivitelerinin arttığı ( $P<0.05$ ) gözlemlendi. SP grubunda artan ALP aktivitelerinin ZO'un 25 mg ve 50 mg' lık dozlarında azaldığı ( $P<0.05$ ) tespit edildi.



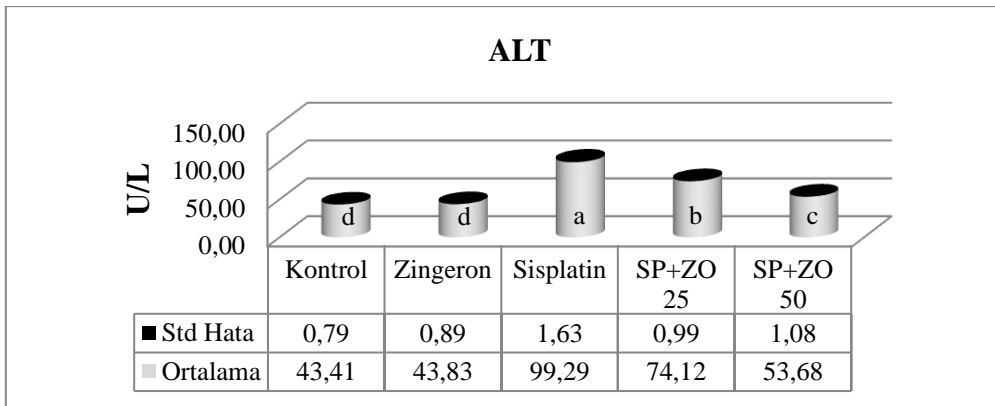
Şekil 1. Serum ALP Aktivitesi

Figure 1. Serum ALP Activity

#### 2. Serum ALT Aktivitesi

Kontrol ve ZO grupları ALT aktivitelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı, SP grubunda ALT aktivitelerinin kontrol ve ZO grubuna göre

arttığı ( $P<0.05$ ) belirlendi. Destekleyici tedavi olarak verilen ZO' un her iki dozunun da enzim aktivitesini azalttığı ( $P<0.05$ ) gözlemlendi. Serum ALT aktiviteleri Şekil 2' de belirtilmiştir.



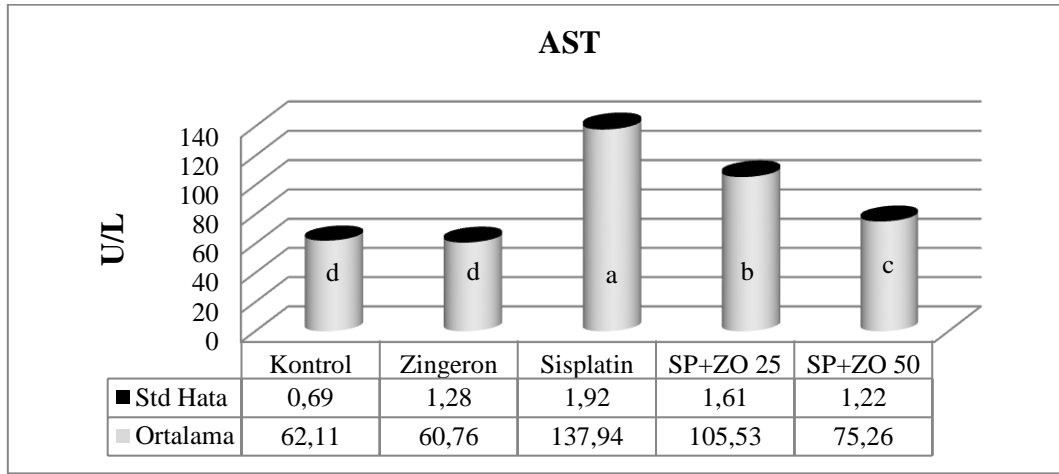
Şekil 2. Serum ALT Aktivitesi

Figure 2. Serum ALT Activity

### 3. Serum AST Aktivitesi

SP uygulamasının serum AST aktivitesi üzerine etkisi Şekil 3' de gösterilmiştir. Buna göre SP' nin AST aktivitesini artırdığı ( $P<0.05$ ), kontrol ile ZO grupları arasında istatistiksel anlamda herhangi bir fark

olmadığı görüldü. Her iki ZO grubunda AST aktivitesinin azaldığı ( $P<0.05$ ), 25 mg' lık dozun enzim aktivitesini yaklaşık 105 U/L, 50 mg' lık dozun ise yaklaşık 75 U/L seviyelerine düşürerek kontrol ve ZO gruplarına yaklaştırdığı saptandı (Şekil 3).

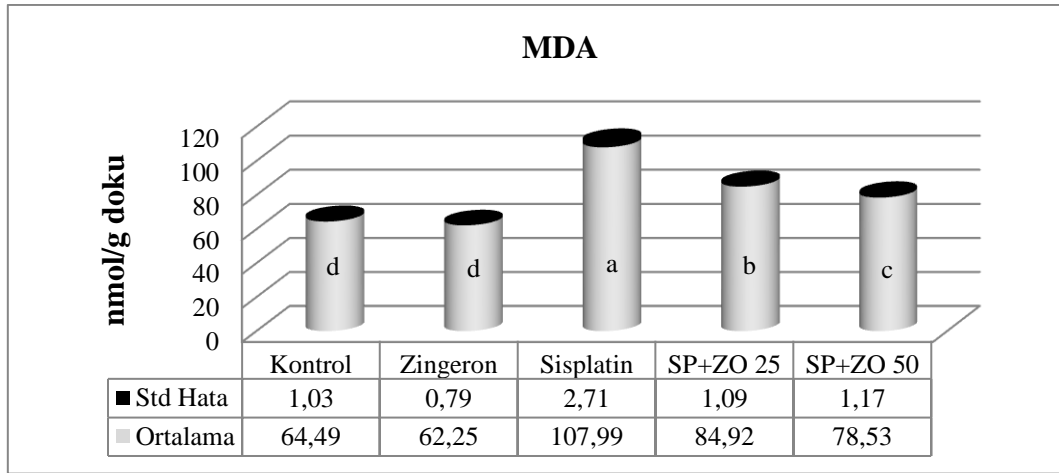


Şekil 3. Serum AST Aktivitesi  
Figure 3. Serum AST Activity

### 4. Karaciğer Dokusu MDA Seviyesi

Karaciğer dokusu MDA seviyeleri incelendiğinde aralarında istatistiksel yönden anlamlı fark olmayan kontrol ve ZO gruplarındaki MDA değerlerinin SP

grubunda yükseldiği ( $P<0.05$ ) görüldü. Uygulanan ZO ile artmış olan MDA seviyelerinin her iki dozda da azaldığı ( $P<0.05$ ), özellikle ZO' un 50 mg' lık dozunun daha etkili olduğu belirlendi (Şekil 4).



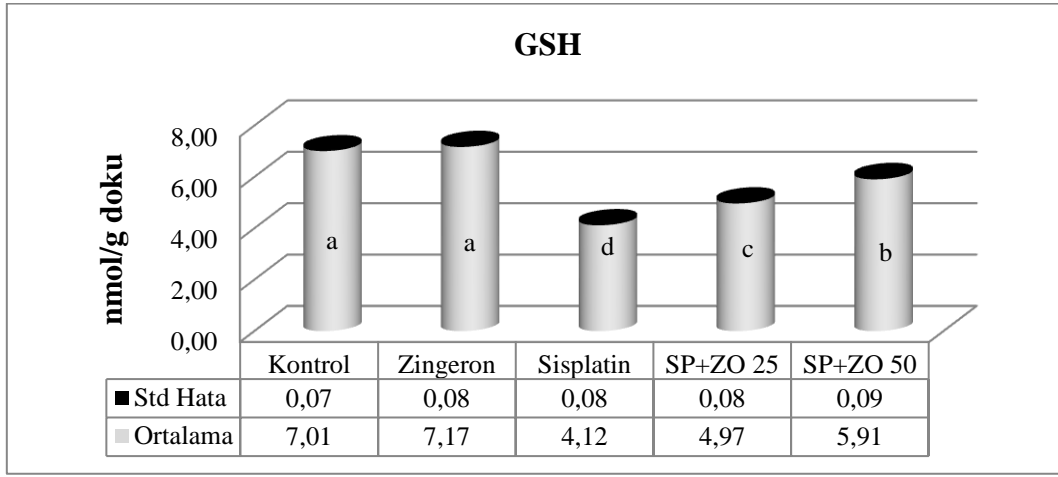
Şekil 4. Karaciğer Dokusu MDA Seviyesi  
Figure 4. Liver Tissue MDA Level

### 5. Karaciğer Dokusu GSH Seviyesi

Nonenzimatik antioksidan olan GSH seviyeleri incelendiğinde (Şekil 5) kontrol grubuna göre SP uygulanan grupta GSH seviyelerinde azalma ( $P<0.05$ )

belirlendi. ZO'un 25 ve 50 mg' lık dozlarının azalan bu seviyeleri artırdığı ( $P<0.05$ ), ZO' un 25 mg' lık dozunun GSH seviyesini artırmada 50 mg' lık dozuna göre daha az etkili olduğu gözlemlendi.



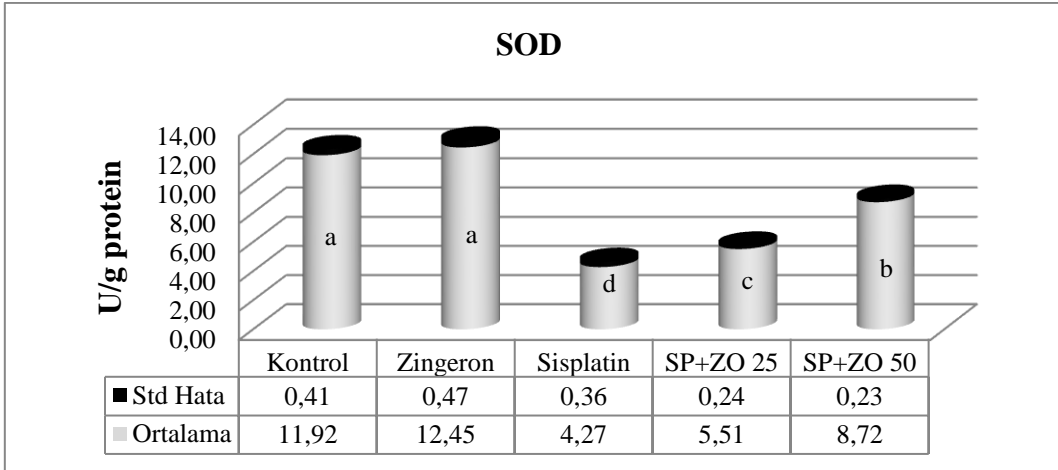


**Şekil 5. Karaciğer Dokusu GSH Seviyesi**  
**Figure 5. Liver Tissue GSH Level**

### 6. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi

Enzimatik antioksidanlardan olan SOD aktivitesinin gruplara göre değişimi Şekil 6' da verilmiştir. SOD' ın kontrol grubundaki aktivitesi  $11.92 \pm 0.41$  U/g protein, ZO grubunda  $12.45 \pm 0.47$  U/g protein olup bu iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı. Kontrol

grubundaki aktivitenin SP grubunda  $4.27 \pm 0.36$  U/g proteine kadar düştüğü ( $P < 0.05$ ) gözlemlendi. SP grubunda azalan SOD aktivitesinin SP+ZO 25 grubunda  $5.51 \pm 0.24$  U/g protein ve SP+ZO 25 grubunda  $8.72 \pm 0.23$  U/g protein değerlerine yükseldiği ( $P < 0.05$ ) tespit edildi.

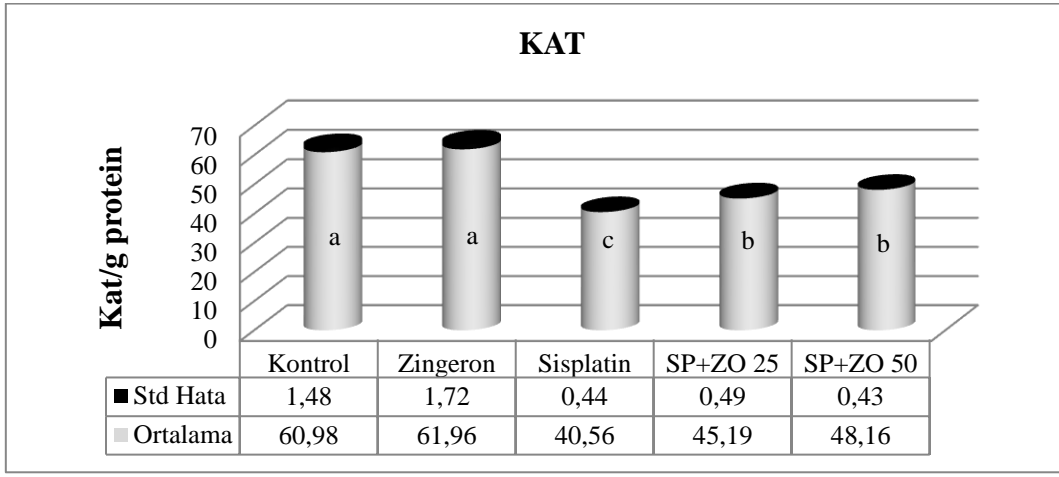


**Şekil 6. Karaciğer Dokusu SOD Aktivitesi**  
**Figure 6. Liver Tissue SOD Activity**

### 7. Karaciğer Dokusu KAT Aktivitesi

Kontrol grubunda KAT aktivitesi  $60.98 \pm 1.48$  kat/g protein ve ZO grubunda  $61.96 \pm 1.72$  kat/g protein olup bu iki grup arasında istatistikî yönden anlamlı fark tespit edilmedi. Kontrol grubundaki aktivitenin SP grubunda  $40.56 \pm 0.44$  kat/g proteine kadar

düştüğü ( $P < 0.05$ ) belirlendi. KAT aktivite değeri SP+ZO 25 grubunda  $45.19 \pm 0.49$  kat/g protein, SP+ZO 50 grubunda ise  $48.16 \pm 0.43$  kat/g protein olarak tespit edilmiş olup bu gruplar arasında önemli bir fark ( $P > 0.05$ ) gözlenmedi. Karaciğer dokusu KAT aktivitesi Şekil 7' de gösterilmiştir.

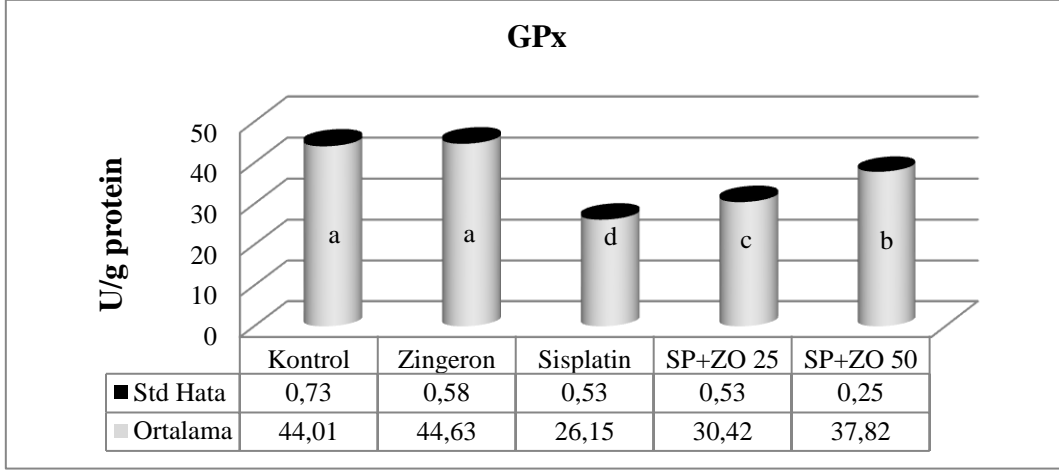


**Şekil 7. Karaciğer Dokusu KAT Aktivitesi**  
**Figure 7. Liver Tissue CAT Activity**

### 8. Karaciğer Dokusu GPx Aktivitesi

Karaciğer dokusu GPx aktivitesi incelendiğinde (Şekil 8) kontrol ve ZO grupları GPx aktivitelerinin benzer olduğu ( $P>0.05$ ), SP uygulamasının aktiviteyi bu

gruplara göre azalttığı ( $P<0.05$ ), ZO' un her iki dozunda antioksidan sistemi kuvvetlendirerek aktiviteyi artırmada etkili olduğu belirlendi ( $P<0.05$ ).

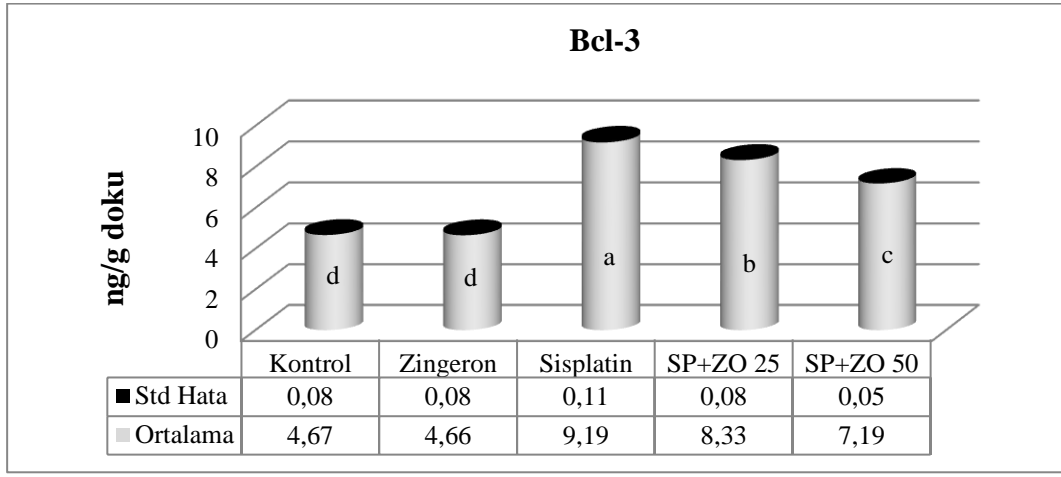


**Şekil 8. Karaciğer Dokusu GPx Aktivitesi**  
**Figure 8. Liver Tissue GPx Activity**

### 9. Karaciğer Dokusu Bcl-3 Seviyesi

Karaciğer dokusu Bcl-3 seviyeleri Şekil 9' da gösterildi. Buna göre Bcl-3 seviyesinde kontrol ile ZO grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı belirlendi. SP uygulamasının kontrol

grubuna göre Bcl-3 seviyelerini artırdığı ( $P<0.05$ ), ZO uygulamasının ise artan bu seviyeleri iki farklı (25 ve 50 mg' lık) dozda da azalttığı ve gruplar arası istatistiksel yönden anlamlı fark olduğu tespit edildi.

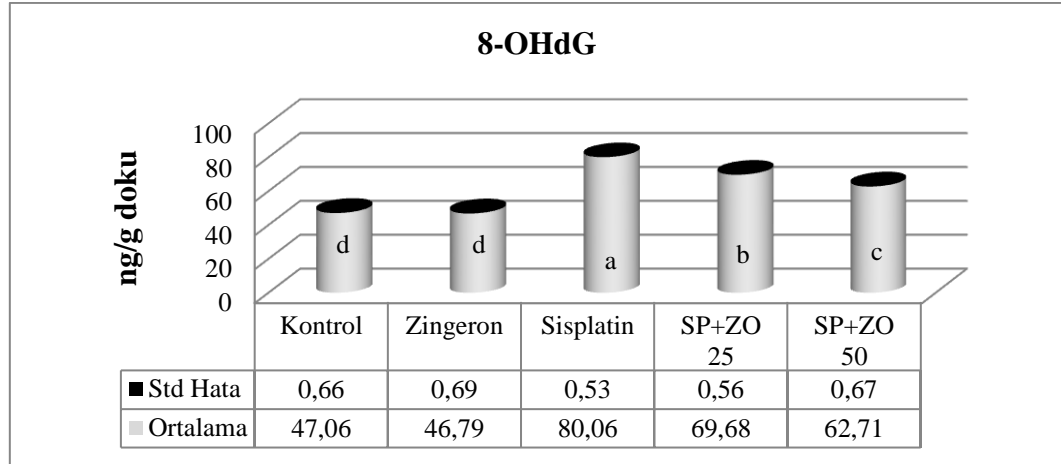


**Şekil 9.** Karaciğer Dokusu Bcl-3 Seviyesi  
**Figure 9.** Liver Tissue Bcl-3 Level

### 10. Karaciğer Dokusu 8-OHdG Seviyesi

DNA hasarının en önemli belirteçlerinden olan 8-OHdG' in (Şekil 10) kontrol grubunda  $47.06 \pm 0.66$  ng/g doku ve ZO grubunda  $46.79 \pm 0.69$  ng/g doku seviyelerinde olduğu ve gruplar arası istatistikî yönden anlamlı fark olmadığı belirlendi. SP grubunda ise

kontrol grubuna göre seviyenin yükselerek  $80.06 \pm 0.53$  ng/g doku olduğu ( $P < 0.05$ ) saptandı. ZO' un 25 ve 50 mg olmak üzere uygulanan iki farklı dozunda da SP grubunda artan seviyeleri sırasıyla  $69.68 \pm 0.56$  ng/g doku ve  $62.71 \pm 0.67$  ng/g doku seviyelerine düşürdüğü ( $P < 0.05$ ) tespit edildi.

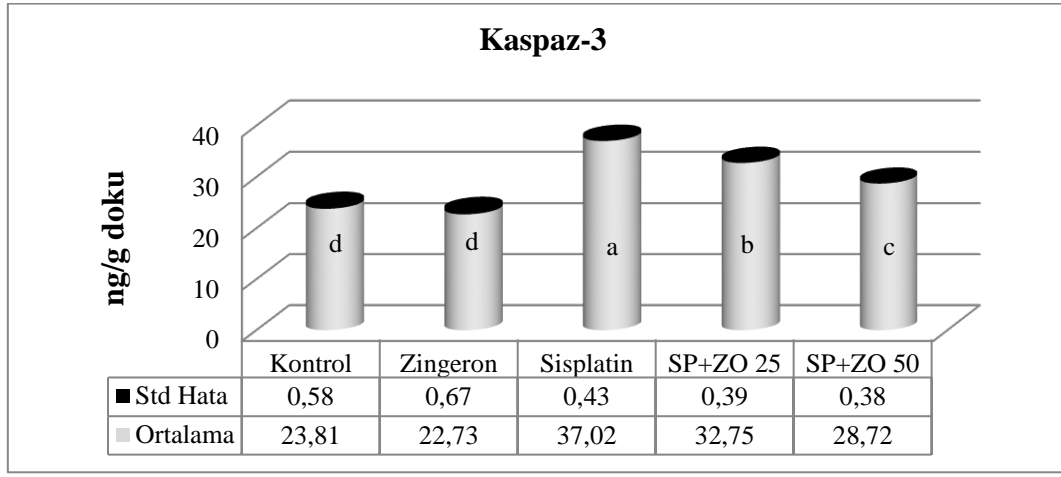


**Şekil 10.** Karaciğer Dokusu 8-OHdG Seviyesi  
**Figure 10.** Liver Tissue 8-OHdG Level

### 11. Karaciğer Dokusu Kaspaz-3 Aktivitesi

Karaciğer dokusu kaspaz-3 aktivitesi incelendiğinde (Şekil 11), kontrol ve ZO grupları kaspaz-3 aktiviteleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olmadığı gözlemlendi. SP grubunda kontrol grubuna göre kaspaz-3

aktivitesinin arttığı ve apoptozisin hızlandığı ( $P < 0.05$ ) belirlenirken uygulanan ZO' un bu aktiviteleri azaltmada ( $P < 0.05$ ) başarılı olduğu ve apoptozisi yavaşlattığı tespit edildi.

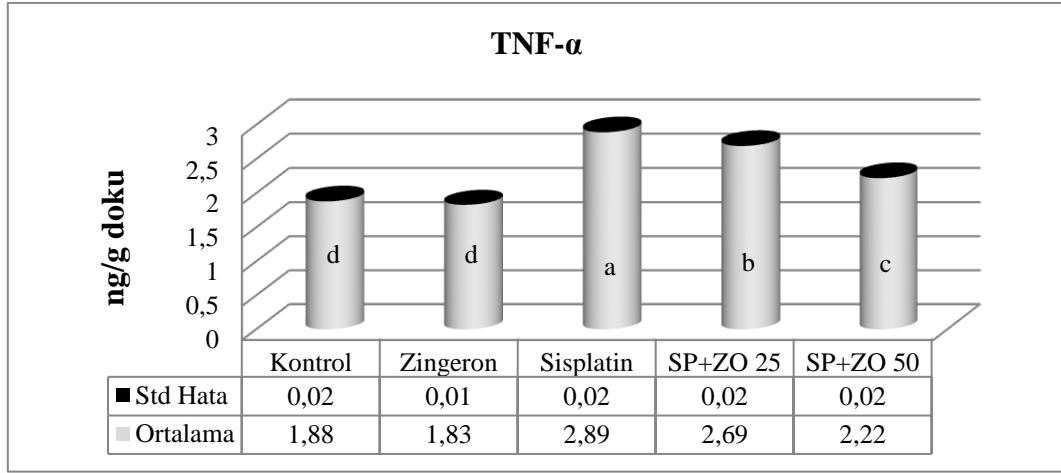


**Şekil 11.** Karaciğer Dokusu Kaspaz-3 Aktivitesi  
**Figure 11.** Liver Tissue Caspase-3 Activity

### 12. Karaciğer Dokusu TNF- $\alpha$ Seviyesi

Karaciğer dokusu TNF- $\alpha$  seviyeleri Şekil 12' de gösterilmiştir. TNF- $\alpha$  seviyeleri kontrol grubunda  $1.88 \pm 0.02$  ng/g doku, ZO grubunda  $1.83 \pm 0.01$  ng/g doku olarak belirlendi ve bu iki grup arasında istatistiksel yönden anlamlı fark olmadığı saptandı. SP

grubunda ise kontrol grubuna göre değerlerin yükseldiği ve  $2.89 \pm 0.02$  ng/g dokuya ulaştığı ( $P < 0.05$ ) belirlendi. ZO uygulamasının, SP grubunda artan bu seviyeyi 25 mg' lık dozda  $2.69 \pm 0.02$  ng/g doku ve 50 mg' lık dozda  $2.22 \pm 0.02$  ng/g dokuya kadar azalttığı ve inflamasyonu hafiflettiği ( $P < 0.05$ ) tespit edildi.

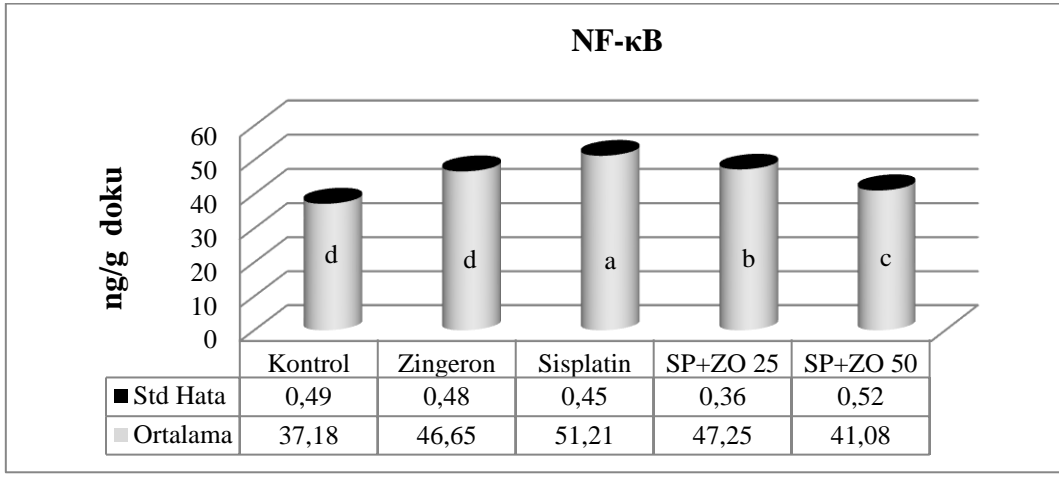


**Şekil 12.** Karaciğer Dokusu TNF- $\alpha$  Seviyesi  
**Figure 12.** Liver Tissue TNF- $\alpha$  Level

### 13. Karaciğer Dokusu NF- $\kappa$ B Seviyesi

SP uygulamasının NF- $\kappa$ B seviyelerini kontrol grubuna göre artırdığı ( $P < 0.05$ ) görülürken, SP ile birlikte

uygulanan ZO' un her iki dozunun da NF- $\kappa$ B seviyelerini azaldığı ( $P < 0.05$ ) tespit edildi. Karaciğer dokusu NF- $\kappa$ B seviyeleri Şekil 13' de gösterilmiştir.

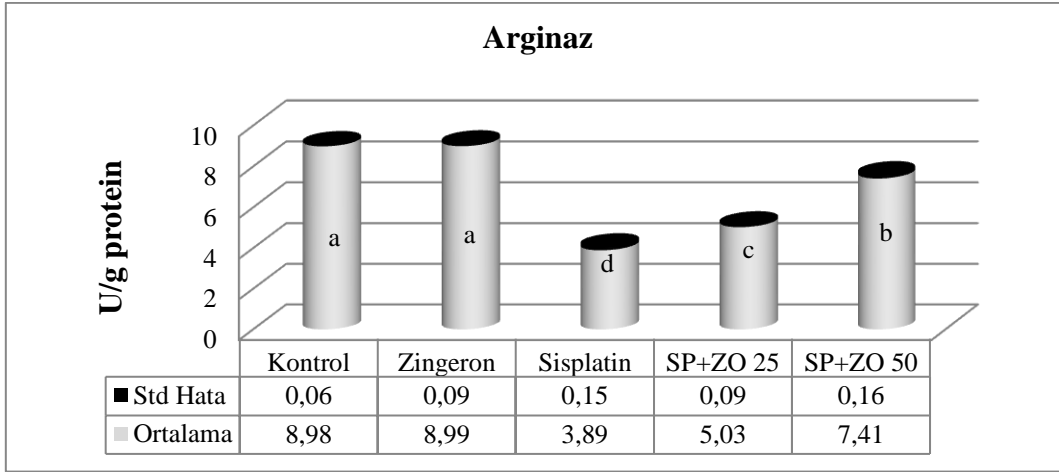


**Şekil 13.** Karaciğer Dokusu NF-κB Seviyesi  
**Figure 13.** Liver Tissue NF-κB Level

#### 14. Karaciğer Dokusu Arginaz Aktivitesi

Karaciğer dokusu arginaz aktivitesi incelendiğinde (Şekil 14), kontrol ve ZO gruplarında aktivitenin benzer olduğu ve bu iki grup arasında önemli bir fark olmadığı ( $P>0.05$ ) saptandı. Kontrol grubuna göre SP

grubunda arginaz aktivitesinin azaldığı ( $P<0.05$ ), SP+ZO 25 ve SP+ZO 50 gruplarında ise azalan bu aktivitenin artmaya başladığı ( $P<0.05$ ) ve 50 mg'lık dozun aktivitenin artmasında daha etkili olduğu belirlendi.

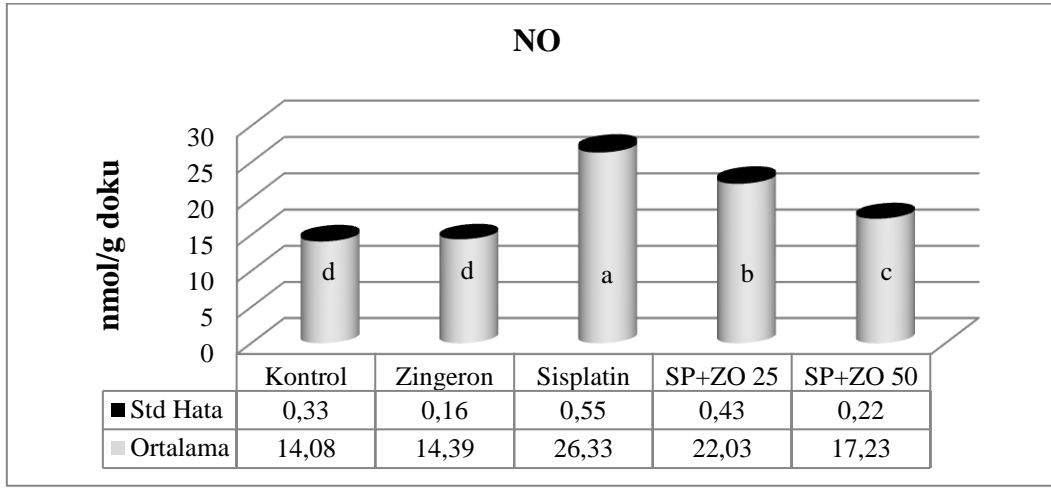


**Şekil 14.** Karaciğer Dokusu Arginaz Aktivitesi  
**Figure 14.** Liver Tissue Arginase Activity

#### 15. Karaciğer Dokusu NO Seviyesi

Kontrol grubunda  $14.08 \pm 0.33$  nmol/g doku düzeylerinde olan NO' in ZO grubunda  $14.39 \pm 0.16$  nmol/g doku seviyelerinde olduğu ve bu iki grup arasında istatistiksel yönden anlamlı fark olmadığı görüldü. SP grubunda ise kontrol grubuna göre NO seviyesinin artarak  $26.33 \pm 0.55$  nmol/g doku

seviyelerine yükselttiği ( $P<0.05$ ), SP ile birlikte verilen ZO' un 25 mg'lık dozunun NO seviyesini  $22.03 \pm 0.43$  nmol/g doku, 50 mg'lık dozunun ise  $17.23 \pm 0.22$  nmol/g doku seviyesine düşürdüğü tespit edildi ( $P<0.05$ ). Karaciğer dokusu NO seviyeleri Şekil 15' de gösterilmiştir.



**Şekil 15.** Karaciğer Dokusu NO Seviyesi  
**Figure 15.** Liver Tissue NO Level

## TARTIŞMA

Karaciğer toksisitesi; kemoterapik ajanlar, ağır metaller ve alkol gibi toksik maddelere maruz kalınmasıyla ortaya çıkan ve tüm dünyada yaygın olarak görülen bir durumdur (Çoşkun ve ark. 2021, Auger ve ark. 2015, Casas-Grales ve Muriel, 2015). Oksidatif stress, özellikle karaciğerde fibrozu başlatarak siroz gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasında tetikleyici etkiye sahiptir ve antioksidanlar bu hastalıkların engellenmesinde önemli rol oynar (Kandemir ve ark. 2017a).

Kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılan bir ajan olan SP' in yüksek dozları karaciğer ve böbrek toksisitesi gibi komplikasyonlara yol açar (Kandemir ve ark. 2019). Yıldırım ve ark. (2013), bu ajanın hayvanlarda hepatotoksisiteye neden olduğunu ve antioksidan uygulamasının SP kaynaklı patolojik değişiklikleri iyileştirdiğini saptamışlardır.

Kemoterapötik hasar, alkolik hepatit ve viral hepatit gibi bazı yaygın karaciğer hastalıkları çeşitli şekillerde ortaya çıkabilir (Wandall, 2018). Karaciğer hasarlarının gerçek nedeninin tespitinde ve tedavisinde öncelikle karaciğer fonksiyon testleri olarak bilinen AST, ALT ve ALP aktivitelerindeki artışın değerlendirilmesi gereklidir (Kandemir ve ark. 2012, Eldutar ve ark. 2017).

Kimyasal ajanlarla deneysel karaciğer hasarı oluşturulan bazı çalışmalarda serum ALP, ALT ve AST aktivitelerinde yükselme olduğu, ZO uygulamasının ise bu aktiviteleri azaltarak hepatoprotektif etki gösterdiği bildirilmiştir (Mani ve ark. 2016, Kumar ve ark. 2014). Mevcut çalışma SP grubunda serum ALP, ALT ve AST aktivitelerindeki artışın hepatik işlev bozukluğuna yol açması, ZO'un ise bu enzim aktivitelerini düşürerek karaciğer fonksiyonlarını normale yaklaştırdığı tespit edilmiştir.

Bazı primer ve sekonder lipid peroksidasyon ürünlerinin ayrışmasıyla oluşan MDA, oksidatif hasarın en önemli göstergesidir (Gür ve ark. 2020, Yıldırım ve ark. 2011). Gür ve ark. (2020) MDA ve

GSH düzeylerinin karaciğerde meydana gelen oksidatif hasarı belirlemek için önemli parametreler olduklarını belirtmişler ve SP'nin antioksidan savunma mekanizmasının etkinliğini azaltarak karaciğerde lipid peroksidasyonuna yol açabilen oksidatif strese neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Ileriturk ve ark. (2020) benzer bir antikanser ilacıyla yaptıkları çalışmada kemoterapötik uygulanan grubun MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre artış olduğunu ve antioksidan uygulaması ile artan MDA seviyelerinin azaldığını belirtmişlerdir. Konu ile benzer şekilde planlanarak yürütülen farklı çalışmalarda da antioksidan uygulamalarının MDA düzeylerini azalttığı belirlenmiştir (Aksu ve ark. 2016a, Kandemir ve ark. 2017b, Gur ve ark. 2021). Sunulan çalışmada da benzer sonuçlar elde edilmiş olup, SP grubunda MDA seviyelerinde yükselme, ZO uygulaması yapılan gruplarda ise MDA düzeylerinde azalma gözlenmiştir. ZO' nun farklı çalışmalarda çeşitli kimyasal ajanlar tarafından artırılan MDA düzeylerinde azalma sağladığı rapor edilmiştir (Cui ve ark. 2018, Cheong ve ark. 2016).

GSH, hücreleri oksidatif hasara karşı korumak için peroksidlerle reaksiyona giren en önemli antioksidan moleküldür. Genellikle sitokrom p450'ye bağlı monooksijenaz tarafından oluşturulur ve başta karaciğer olmak üzere diğer dokularda yüksek düzeylerde bulunur (Manjunatha ve ark. 2013, Küçükler ve ark. 2020). Bu molekül, enzimatik olmayan antioksidan sistemdeki zayıflama durumunda hepatotoksisite için hayati bir rol oynar (Kaymaz ve ark. 2017). GSH'nin oksidatif strese maruz kalan hücrelerde adaptasyon yoluyla sentezlendiği ve bu hücrelerin GSH' un biyosentezini düzenleyebileceği bildirilmiştir (Benzer ve ark. 2018, Kucukler ve ark. 2020). Mevcut çalışmada, SP grubunda GSH düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Yıldırım ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada SP' in GSH düzeylerini azalttığını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde antioksidanların GSH düzeylerini artırdığı farklı çalışmalar da bildirilmiştir (Yardım ve ark. 2021,



Kucukler ve ark. 2021a). Sunulan çalışmada da uygulanan ZO' un her iki dozunda da (SP+ZO 25 mg/kg ve SP+ZO 50 mg/kg) SP grubunda azalan GSH düzeylerinin arttığı belirlenmiştir. ZO' un GSH düzeylerini artırdığı birçok çalışmada belirtilmiştir (Safhi 2018, Soliman ve ark. 2018).

Antioksidan enzimlerden biri olan GPx, GSH' u kullanarak hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin parçalanmasını katalize eder, böylece membran lipidlerini korur (Yılmaz ve ark. 2020). Aksu ve ark. (2016b) yaptıkları çalışmada SP'nin antioksidan enzimleri etkilediğini ve GPx aktivitesini azalttığını bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada da SP grubunda kontrol grubuna göre GPx aktivitesinin azaldığı, SP grubunda azalmış olan aktivitenin ZO' nun iki farklı dozunda da arttığı tespit edilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarda da antioksidanların GPx aktivitesinde artışa neden olduğu saptanmıştır (Kandemir ve ark. 2015, Kandemir ve ark. 2017a).

Süperoksit radikalının H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eden SOD, karaciğer toksisitesinde incelenmesi gereken en önemli parametrelerden biri olup, organizmada substrat olarak serbest radikalleri kullanan tek enzimdir (Kandemir ve ark. 2018a). Almaghrabi (2015) SP grubunda SOD aktivitesinin azaldığını belirtmiştir. Ayrıca farklı kimyasal ajanların kullanılması ile oluşturulan hasarlarda SOD aktivitesinde azalma olduğu bildirilmiştir (Kandemir ve ark. 2017b ). Mevcut çalışmada, SP grubunda SOD aktivitesi azalmış ve ZO uygulanan gruplarda azalan bu aktivite tekrar artmıştır. ZO' un antioksidan sistemi güçlendirdiği yapılan farklı çalışmalarda da ortaya konmuştur (Kandemir ve ark. 2019, Cheng ve ark. 2018).

KAT, çeşitli dokularda eksprese edilen antioksidan enzimdir ve hücreleri, hidrojenin zararlı etkilerine karşı korur (Hanedan ve ark. 2018). Bu enzim, SOD ile birlikte aktif oksijen türlerini ortadan kaldırmak için birlikte çalışır (Kandemir ve ark. 2017c, Kucukler ve ark. 2021b, İnce ve ark. 2012). Peroksizomlarda üretilen KAT, serbest radikallere karşı hücrel savunmada görev alır ve birincil H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> temizleyicisidir (Yardim ve ark. 2020). Koç ve ark. (2015) KAT aktivitesinin SP grubunda azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da KAT aktivitesinin SP grubunda azaldığı, 25 mg ve 50 mg ZO dozlarının ise bu aktiviteyi artırdığı tespit edilmiştir. ZO ve diğer doğal antioksidan uygulamalarının KAT aktivitesini artırdığı yapılan literatür taramalarından anlaşılmaktadır (Kandemir ve ark. 2017c, Kandemir ve ark. 2017d, Caglayan ve ark. 2018, Alan 2018, Kandemir ve ark. 2019).

Diğer I $\kappa$ B' lerden farklı olarak Bcl-3, bir trans-aktivasyon alanı ihtiva eden nükleer bir proteindir ve NF- $\kappa$ B' ye cevap veren promotörlere eklenebilir. Sonuçta NF- $\kappa$ B komplekslerinin alt-birim kompozisyonuna bağlı olarak transkripsiyonel aktivasyon veya baskıya neden olur. NF- $\kappa$ B, oksidatif strese bağlı hücre aktivasyonunda önemli düzenleyici

moleküllerden biridir. NF- $\kappa$ B; stres, inflamatuvar yanıt, hücrel proliferasyon ve transformasyonda rol oynayan genler, oksidatif stres, transkripsiyon ve anti-kanser ajanlarına direnç gibi hücrel fenotip üzerinde büyük bir etkiye sahiptir (Kandemir ve ark. 2021).

Aktifleştirilmiş T hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilen bir sitokin olarak tanınan TNF- $\alpha$ , inflamatuvar yanıtı düzenler. Literatür bilgileri, TNF- $\alpha$  ile uyarılmış sinyalleme yollarının hücre büyümesi, onkojenik transformasyon, hücre proliferasyonu ve hücre ölümüne (apoptoz) dahil olduğunu göstermektedir (Barry 2004). Poveda ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada SP' in Bcl-3 seviyelerini artırdığını bildirmişlerdir. Dhar ve ark. (2015) SP grubunda NF- $\kappa$ B ile TNF- $\alpha$  değerlerinde artışın olduğunu ve uyguladıkları antioksidanın bu seviyelerde düşüşe yol açtığını tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmada karaciğer dokusunda ölçülen Bcl-3, NF- $\kappa$ B ve TNF- $\alpha$  seviyelerinde SP kaynaklı yükselme görülmüş, v ZO' nun uygulanan 25 mg ve 50 mg'lık dozlarının bu parametrelerde azalmayı sağladığı belirlenmiştir. ZO' nun Bcl-3 (Kandemir ve ark. 2018a, Yuoungke ve Arthur 2006), TNF- $\alpha$  (Hemalatha ve Prince 2016, Songa ve ark. 2016) ve NF- $\kappa$ B (Kandemir ve ark. 2019) seviyelerini azaltarak inflamasyonu hafiflettiğini bildiren çeşitli çalışmalar, elde ettiğimiz verilerle uyum göstermektedir.

8-OHdG oksidatif stresin en önemli biyobelirteçlerinden olup, DNA hasarın belirlenmesinde kullanılan önemli bir göstergedir (Purdy ve ark. 2016, Persson ve ark. 2014). Mercantepe ve ark. (2018) SP grubunda 8-OHdG seviyelerinde yükselme olduğunu ve DNA hasar derecesinin arttığını bildirmişlerdir. Kandemir ve ark. (2019) SP verdikleri ratlarda 8-OHdG düzeylerinin arttığını ve ZO' un bu düzeyleri azalttığını belirtmişlerdir. İnce ve ark. (2012) SP ile yapmış oldukları çalışmada antioksidan uygulamasının 8-OHdG değerlerini azalttığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da 8-OHdG değerlerinde kontrol grubuna göre SP grubunda artış olduğu gözlenirken, uygulanan ZO' un 25 mg ve 50 mg'lık dozlarının 8-OHdG düzeylerinde azalmayı sağladığı ve DNA hasarını azalttığı tespit edilmiştir.

L-argininin, üreye ve ornitine hidrolizini katalize eden arginaz üre döngüsünün son enzimidir (İleritürk ve ark. 2021, Kandemir ve Özdemir, 2008). Arginaz tarafından katalize edilen L-arginin'den ornitin oluşumu poliaminlerin sentezinde ilk adımdır (Kandemir ve Özdemir 2009, Özçelik ve ark. 2010, Hanedan ve ark 2017). Kopylchuk ve ark. (2017) SP ile benzer toksik etkilere sahip bir ajan ile oluşturdukları karaciğer toksisitesinde arginaz aktivitesini incelemişler ve bu grupta arginaz aktivitesinin azaldığını bildirmişlerdir. Kandemir ve ark. (2013) arginaz aktivitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, hasta hayvanların dokularındaki arginaz aktivitesinin, sağlıklı hayvanlardan elde edilen dokulara göre önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Aksu ve ark. (2015) arginaz aktivitesinin

hücre bölünmesi, çoğalması ve farklılaşmasında önemli bir role sahip olduğunu ifade etmişlerdir. Kandemir ve ark. (2010), sağlıklı hayvanların eritrosit arginaz aktivitesinin, hasta hayvanlara göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, SP' in karaciğer arginaz aktivitesini düşürdüğü ve NO seviyesini artırdığı saptanmıştır. Bunun da muhtemel nedeni olarak L-arginini substrat olarak kullanan arginaz ve nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinin yarışması sonucunda dengenin NOS yönüne kayarak NO üretiminde artışa neden olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. SP ile birlikte verilen ZO, arginaz aktivitesini artırırken NO seviyelerini azaltmıştır. Bu nedenle ZO' un arginaz-NOS dengesini arginaz yönüne kaydırarak poliamin biyosentezini hızlandırdığı ve iyileşme sürecine katkıda bulunduğu düşünülmektedir.

NO; vazoaaktif, sitotoksik, trombosit düzenleyici ve nörotransmitter ajanı olarak güçlü biyolojik aktiviteye sahiptir ve çeşitli kardiyovasküler hastalıklarda önemli bir rol oynar. Kandemir ve ark. (2021) SP' e benzer toksik etkilere sahip farklı ajanların oksidatif stres ve NO seviyelerinde artışa neden olduğunu bildirmişlerdir. Mevcut çalışmada da SP grubunda NO seviyelerinin artmış olduğu tespit edilmiştir. Farklı antioksidanlarla yapılan çalışmalarda NO değerlerinin antioksidanlar tarafından azaltıldığı yapılan literatür taramalarından anlaşılmaktadır (Heeba ve Mahmoud 2016). Mevcut çalışmada da SP ile kombine kullanılan ZO' nun SP grubuna göre NO değerlerini düşürdüğü gözlenmiştir.

Apoptoz, organellerin ve diğer hücre sel yapıların hızla uzaklaştırılmasıyla sonuçlanan spesifik enzimler olan aktif kaspaslar tarafından gerçekleştirilen programlanmış hücre ölümüdür (Çelik ve ark 2020). Kaspaz-3, apoptozdan sorumlu bir proteaz ailesi olup, karaciğer hasarını tespit etmek için önemli bir parametre olarak düşünülmüş ve ilerleyen karaciğer fibrozu ile ilişkilendirilmiştir (Bantel ve ark. 2004). Penelope ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada SP' in kaspaz-3 aktivitesini artırdığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada antioksidan uygulaması ile destekleyici tedavi yapılmış ve kaspaz-3 aktivitesi azaltılmıştır. Antioksidanların kaspaz-3 aktivitesinde azalma sağladığı ve apoptosizi yavaşlattığı farklı çalışmalarda da bildirilmiştir (Aksu ve ark. 2016a, Kandemir ve ark. 2017, Nemat ve ark. 2014, Eldutar ve ark. 2017). Sunulan çalışmada da SP grubunda kaspaz-3 aktivitesinde artış olduğu ve apoptosizin arttığı, SP ile kombine verilen ZO' un her iki dozunda (25mg ve 50 mg) kaspaz-3 aktivitesini azaltarak apoptosizi yavaşlattığı belirlenmiştir.

## SONUÇ

SP kaynaklı karaciğer toksisitesi üzerine ZO' un antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptotik özelliklerinden dolayı etkili olduğu ve SP kaynaklı karaciğer toksisitesine karşı ZO kullanımının yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

**Declaration of competing interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

This study was summarized from the first author's master's thesis "Investigation of the effect of zingerone on some biochemical parameters in rats developed liver toxicity with cisplatin"

**Ethics approval and consent to participate** Ethics committee approval required to conduct the study was obtained from the Local Ethics Council of Animal Experiments ( Approval no: 2017-11/133 ).

## KAYNAKLAR

- Aebi H, Catalase BH, GraBI M.** Methods of Enzymatic Analysis. Angew Chem Int Ed Engl. 1983; 3: 273-286.
- Aksu EH, Kandemir FM, Altun S, Kucukler S, Comaklı S, Omur AD.** Ameliorative effect of carvedilol on cisplatin-induced reproductive damage in male rats. J Biochem Mol Toxicol. 2016b; 30(10): 513-520.
- Aksu EH, Kandemir FM, Kılıç K, Akman O, Ömür AD, Uçar Ö.** Arginase activity of ovarian structures in cows of Brown Swiss and its cross-breeds. Vet Arhiv. 2015; 85: 261-271.
- Aksu EH, Özkaraca M, Kandemir FM, Ömür AD, Eldutar E, Küçükler S.** Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress. Andrologia. 2016a; 48: 1145-1154.
- Almaghrabi OA.** Molecular and biochemical investigations on the effect of quercetin on oxidative stress induced by cisplatin in rat kidney. Saudi J Biol Sci. 2015; 22: 227-231.
- Auger C, Alhasawi A, Contavadoo M, Appanna VD.** Dysfunctional mitochondrial bioenergetics and the pathogenesis of hepatic disorders. Front Cell Dev Biol. 2015; 3: 65-83.
- Bantel H, Lügering A, Heideman J, Volkmann X, Poremba C, Strassburg C, Manns MP, Schulze-Osthoff K.** Detection of apoptotic caspase activation in sera from patients with chronic HCV infection is associated with fibrotic liver injury. Hepatology. 2004; 40(5): 1078-1087.
- Barry GG, John EH.** Individual differences in perception of bitterness from capsaicin, piperine and zingerone. Chem Senses. 2004; 29: 53-60.
- Benzer F, Kandemir FM, Ozkaraca M, Kucukler S, Caglayan S.** Curcumin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by abrogation of inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage, and protein oxidation in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2018;32:e22030.
- Bilal A, Muneeb UR, Insha A, Ahmad A, Saiema R, Showkat AB, Insha A, Ishraq H, Sheikh B, Manzoorur RM. A** Review on pharmacological properties of zingerone [4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-butanone]. Sci World J. 2015; 6: 101-155.
- Caglayan C, Temel Y, Kandemir FM, Yildirim S, Kucukler S.** Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy. Environ Sci Pollut Res. 2018; 25(21): 20968-20984.
- Casas-Grajales S, Muriel P.** Antioxidants in liver health. World J Gastrointest Pharmacol Ther. 2015; 6(3): 59-72.
- Cayin YF, Erdogan MA, Sahin N, Parlakpınar H, Atayan Y, Polat A, Vardi N, Yildiz A, Tanbek K.** Protective effects of apocynin on cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. Arch Med Res. 2015; 46(7): 517-526.
- Celik H, Kucukler S, Ozdemir S, Comaklı 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 rat. *NeuroToxicology*. 2020; 80: 29-40.
- Cheng T, Hsu Y, Lu F, Chen Y, Tsai N, Chen W, Tsai C.** Nephroprotective effect of electrolyzed reduced water against cisplatin-induced kidney toxicity and oxidative damage in mice. *J Chin Med Assoc*. 2018; 81: 119-126.
- Cheong KO, Shin D, Bak J, Lee C, Kyung KW, Je NK, Chung HY, Moon SY.** Hepatoprotective effects of zingerone on carbon tetrachloride and dimethylnitrosamine-induced liver injuries in rats. *Arch Pharm Res*. 2016; 39(2): 279-291.
- Cui Y, Shi Y, Bao Y, Wang S, Hua WQ, Liu Y.** Zingerone attenuates diabetic nephropathy through inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Biomed J Pharmacother*. 2018; 99: 422-430.
- Cure MC, Cure E, Kalkan Y, Kirbas A, Tumkaya L, Yilmaz A, Turkyilmaz AK, Sehitoglu I, Yuce S.** Infliximab modulates cisplatin-induced hepatotoxicity in rats. *Balkan Med J*. 2016; 33(5): 504-511.
- Çoşkun P, Benzer F, Kandemir FM, Yıldırım S, Küçükler S.** Ratlarda kurşun asetat kaynaklı karaciğer hasarı üzerine chrysin' in etkilerinin araştırılması. *Tr Doğa ve Fen Derg*. 2021; 8(2): 250-261.
- Dhar BS, Kumar JM, Sistla R.** Baicalein, a bioflavonoid, prevents cisplatin-induced acute kidney injury by up-regulating antioxidant defenses and down-regulating the maps and NF- $\kappa$ B pathways. *Nature*. 2015; 10: 39-52.
- Eldutar E, Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C.** Restorative effects of Chrysin pretreatment on oxidant-antioxidant status, inflammatory cytokine production, and apoptotic and autophagic markers in acute paracetamol-induced hepatotoxicity in rats: An experimental and biochemical study. *J Biochem Mol Toxicol*. 2017; 31: 1-6.
- Geyer JW, Dabich D.** Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. *Anal Biochem*. 1971; 39: 412-417.
- Grover JK, Yadav S, Vats V.** Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol*. 2002; 81(1): 81-100.
- Gur C, Kandemir FM, Darendelioglu E, Caglayan C, Kucukler S, Kandemir O, İleritürk M:** Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environ Sci Pollut Res*. 2021; DOI:10.1007/s11356-021-14049-4.
- Gür C, Kandemir FM, Genç A.** Bortezomib ile kalp hasarı oluşturulan ratlarda berberinin oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *Tr Doğa ve Fen Derg*. 2020; 9(2): 118-126.
- Hanedan B, Kirbas A, FM Kandemir, Aktas MS, Yıldız A.** Evaluation of arginase activity, nitric oxide and oxidative stress status in sheep with contagious agalactia. *Acta Vet Hung*. 2017; 65: 394-401.
- Hanedan B, Ozkaraca M, Kirbas A, Kandemir FM, Aktas MS, Kilic K, Comakli S, Kucukler S. Bilgili A.** Investigation of the effects of hesperidin and chrysin on renal injury induced by colistin in rats. *Biomed J Pharmacother*. 2018; 10(1): 1607-1616.
- Heeba GH, Mahmoud ME.** Dual effects of quercetin in doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats and its modulation of the cytotoxic activity of doxorubicin on human carcinoma cells. *Environ Toxicol*. 2016; 31(5): 624-636.
- Hemalatha KL, Prince PSM.** Anti-inflammatory and anti-thrombotic effects of zingerone in a rat model of myocardial infarction. *Eur J Pharmacol*. 2016; 791: 595-602.
- İleritürk M, Benzer F, Aksu EH, Yıldırım S, Kandemir FM, Doğan T, Genç A.** Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties. *J Food Biochem*. 2020; 45(2): e13593.
- Ince S, Keles H, Erdogan M, Hazman O, Kucukkurt I.** Protective effect of boric acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. *Drug Chem Toxicol*. 2012; 35: 285-292.
- İleritürk M, Doğan T, Kandemir Ö.** Ratlarda bortezomib kaynaklı dalak hasarı üzerine berberinin arginaz aktivitesi ve oksidan-antioksidan parametreler ile incelenmesi. *Kocatepe Vet J*. 2021; 14(1): 6-15.
- Kandemir F, Yüksel M, Benzer F, Özdemir N.** Sağlıklı ve piyometralı ineklerde eritrosit arginaz aktivitesi ve plazma nitrik oksit düzeyi. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*. 2010; 5(3): 107-112.
- Kandemir FM, Küçükler S, Çağlayan C.** Ratlarda Methotrexate Kaynaklı Karaciğer Toksisitesine Karşı Silymarin ve Naringin'in Yararlı Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Vet Bil Derg*. 2017a; 12 (2): 167-177.
- Kandemir FM, Yıldırım S, Kucukler S, Caglayan C, Mahamadu A, Dortbudak MB.** Therapeutic efficacy of zingerone against vancomycin-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis and aquaporin 1 permeability in rat kidney. *Biomed J Pharmacother*. 2018a; 105: 981-991.
- Kandemir FM, Benzer E, Ozkaraca M, Ceribasi S, Yildirim NC, Ozdemir N.** Protective antioxidant effects of grape seed extract in a cisplatin-induced hepatotoxicity model in rabbits. *Rev Med Vet*. 2012; 163(11): 539-545.
- Kandemir FM, Caglayan C, Darendelioglu E, Kucukler S, Izol E, Kandemir O.** Modulatory effects of carvacrol against cadmium-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity by molecular targeting regulation. *Life Sci*. 2021; 277:119610.
- Kandemir FM, Kucukler S, Caglayan C, Gur C, Batil AA, Gülçin I.** Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and antiautophagic properties. *J Food Biochem*. 2017b; 41: 69-76.
- Kandemir FM, Kucukler S, Eldutar E, Caglayan C, Gülçin İ.** Chrysin protects rat kidney from paracetamol-induced oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy: A Multi-Biomarker Approach. *Sci Pharm*. 2017c; 85 (1): 4.
- Kandemir FM, Ozkaraca M, Kuçukler S, Caglayan C, Hanedan B.** Preventive effects of hesperidin on diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating TGF- $\beta$ 1 and oxidative DNA damage. *Toxin Rev*. 2017d; 10: 1080.
- Kandemir FM, Ozkaraca M, Yildirim AB, Hanedan B, Kirbas A, Kilic K.** Rutin attenuates gentamicin-induced renal damage by reducing oxidative stress, inflammation, apoptosis, and autophagy in rats. *Ren Fail*. 2015; 37(3): 518-525.
- Kandemir FM, Özdemir N.** Koyun dalak doku arginazının bazı kinetik özellikleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*. 2009; 15: 553-559.
- Kandemir FM, Özdemir N.** L-Lizin ve L-ornitin'in sığır böbrek doku arginaz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*. 2008; 22(1): 1-4.
- Kandemir FM, Yıldırım S, Caglayan C, Kucukler S, Eser G.** Protective effects of zingerone on cisplatin-induced nephrotoxicity in female rats. *Environ Sci Pollut Res*. 2019; 26: 22562- 22574.
- Kandemir FM, Yuksel M, Ozdemir N, Devci H.** A different approach to diagnosis of subclinical mastitis: Milk arginase activity. *Vet. Arhiv*. 2013; 83: 603-610.
- Kaymaz MB, Kandemir FM, Pamukçu E, Eröksüz Y, Özdemir N.** Effects of aqueous artichoke (cynara scolymus) leaf extract on hepatic damage generated by alpha-amanitine. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*. 2017; 23(1): 155-160.
- Koc A, Duru M, Ciralik H, Akcan R, Sogut S.** Protective agent, erdosteine, against cisplatin induced hepatic oxidant injury in rats. *Mol Cell Biochem*. 2015; 278: 79-84.

- Kopylchuk HP, Nykolaichuk IM, Zhuretska OM.** Rat liver arginase system under acetaminophen-induced toxic injury and protein deprivation. *Ukr Biochem J.* 2017; 89(2): 92-98.
- Kucukler S, Benzer F, Yildirim S, Gur C, Kandemir FM, Bengu AS, Ayna A, Caglayan C, Dortbudak MB.** Protective Effects of Chrysin Against Oxidative Stress and Inflammation Induced by Lead Acetate in Rat Kidneys: a Biochemical and Histopathological Approach. *Biol Trace Elem Res.* 2021a; 199:1501-1514.
- Kucukler S, Comakli S, Ozdemir S, Caglayan C, Kandemir FM.** Hesperidin protects against the chlorpyrifos-induced chronic hepato-renal toxicity in rats associated with oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and up-regulation of PARP-1/VEGF. *Environ Toxicol.* 2021b; 36:1600-1617.
- 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.* 2020; 259: 118382.
- Kumar L, Chhibber S, Harjai K.** Hepatoprotective effect of zingerone (4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) butan-2-one) in lipopolysaccharide induced liver injury mouse model through down regulation of inflammatory mediators. *Int J Pharmacogn and Phytochem Res.* 2014; 6(2): 308-314.
- Küçükler S, Çomaklı S, Özdemir S, Kandemir FM.** Ratlarda dozetaksel kaynaklı testis toksisitesi üzerine silimarinin etkileri: biyokimyasal, moleküler ve histopatolojik değerlendirme. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.* 2020; 34(1): 13-21.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.
- Mani V, Siddique AI, Arivalagan S, Thomas NS, Namasivayam N.** Zingerone ameliorates hepatic and renal damage in alcohol-induced toxicity in experimental rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* 2016; 6(3): 125.
- Manjunatha JR, Bettadaiah BK, Negi PS, Srinivas P.** Synthesis of quinoline derivatives of tetrahydrocurcumin and zingerone and evaluation of their antioxidant and antibacterial attributes. *Food Chem.* 2013; 136: 650-658.
- Matkovic B, Szabo L, Varga IS.** Determination of enzyme activities in lipid peroxidation and glutathione pathways. *Labor diagnosztika.* 1988; 15: 248-249.
- Mercantepe F, Mercantepe T, Adnan T, Yilmaz A, Tumkaya L.** Protective effects of amifostine, curcumin, and melatonin against cisplatin-induced acute kidney injury. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018; 6: 25-53.
- Nemat A, Summya R, Sana N, Syed KH, Sarwat S.** Beneficial effects of chrysin against methotrexate-induced hepatotoxicity via attenuation of oxidative stress and apoptosis. *Mol Cell Biochem.* 2014; 385: 215-223.
- Özçelik M, Kandemir FM, Özdemir N.** Koyun böbrek doku arginazının etilen diamin tetra asetik asit (edta), para kloromerküri benzoik asit (p-cmba), n-etil maleimid (nem) tarafından inhibisyonu ve inhibisyon kinetiği. *F Ü Sağ Bil Vet Derg.* 2010; 24: 23-27.
- Penelope DS, Francisco JL, Montserrat D, Mart P, ElsaSanchez-Lopez J, Thomaleg M, Jos ML, Ana IM.** Differential effect of quercetin on cisplatin-induced toxicity in kidney and tumor tissues. *Food Chem Toxicol.* 2017; 107: 226-236.
- Persson T, Popescu BO, Cedazo-Minguez A.** Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail. *Oxid Med Cell Longev.* 2014; 18: 42-73.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC.** Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem.* 1966; 16: 359-364.
- Poveda J, Sanz AB, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Cannata-Ortiz P, Sanchez-Nino MD, Ortiz A.** Bcl3: a regulator of NF- $\kappa$ B inducible by TWEAK in acute kidney injury with anti-inflammatory and antiapoptotic properties in tubular cells. *Exp Mol Med.* 2017; 49: 352-369.
- Purdy M, Kokki M, Anttila M.** Does the rectus sheath block analgesia reduce the inflammatory response biomarkers' IL-1ra, IL6, IL-8, IL-10 and IL-1beta concentrations following surgery. A randomised clinical trial of patients with cancer and benign disease. *Anticancer Res.* 2016; 36: 3005-3111.
- Saad SY, Najjar TA, Alashari M.** Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004; 31(12): 862-867.
- Saffi MM.** nephroprotective effect of zingerone against ccl4-induced renal toxicity in swiss albino mice: molecular mechanism. *Oxid Med Cell Longev.* 2018; 1-7.
- Sedlak J, Lindsay RH.** Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem.* 1968; 25: 192-205.
- Soliman AF, Anees LM, Ibrahim DM.** Cardioprotective effect of zingerone against oxidative stress, inflammation, and apoptosis induced by cisplatin or gamma radiation in rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018; 391(8): 819-832.
- Songa J, FanH, Li H, Ding H, Lv Q, Hou S.** Zingerone ameliorates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury by inhibiting Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2016; 772: 108-114.
- Sun Y, Oberley LW, Li Y.** A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 1988; 34: 497-500.
- Wandall JH.** Etiology of chronic liver disease in ethiopia: a case control study with special reference to viral hepatitis and alcohol. *EC Gastroenterol Dig Syst.* 2018; 5: 120-128.
- Yardim A, Kandemir FM, Çomaklı S, Ozdemir S, Caglayan S, Kucukler S, Celik H.** Protective effects of curcumin against paclitaxel-induced spinal cord and sciatic nerve injuries in rats. *Neurochem Res.* 2021; 46: 379-395.
- Yardim A, Kandemir FM, Ozdemir S, Kucukler S, Çomaklı S, Gur C, Celik H.** Quercetin provides protection against the peripheral nerve damage caused by vincristine in rats by suppressing caspase 3, NF- $\kappa$ B, ATF-6 pathways and activating Nrf2, Akt pathways. *Neurotoxicology.* 2020; 81:137-146.
- Yildirim NC, Kandemir FM, Benzer F.** Beneficial effects of grape seed extract against cisplatin-induced testicular damage in rabbits. *Dig J Nanomat Biostruct.* 2011; 6: 155-9.
- Yildirim NC, Kandemir FM, Ceribasi S, Ozkaraca M, Benzer F.** Pomegranate seed extract attenuates chemotherapy-induced liver damage in an experimental model of rabbits. *Cell Mol Biol.* 2013; 59: 1842-1847.
- Yilmaz S, Kandemir FM, Kaya E, Ozkaraca M.** Chemoprotective effects of propolis on aflatoxin b1-induced hepatotoxicity in rats: oxidative damage and hepatotoxicity by modulating tp53, oxidative stress. *Curr Proteom.* 2020; 17(3): 191-199.

## The Effect of Orally High Dose Vitamin C Supplementation on Serum Vitamin C, Leptin and Cortisol Parameters in Rats

Mehmet BAŞEĞMEZ<sup>1\*</sup>, Abdullah ERYAVUZ<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Pamukkale University, Acipayam Vocational High School, Laboratory and Veterinary Health, Denizli, Turkey

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Physiology, Afyonkarabisar, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the changes in the blood levels of vitamin C, cortisol, and leptin, depending on the vitamin C supplementation administered orally at high dose intervals in rats. A total of 21 female Wistar Albino rats aged 6-9 months were randomly divided into three groups, each group containing seven animals. The first group is the control group, and the experiment groups are Vitamin C (1000 mg/kg CA group, orally), Vitamin C (3000 mg/kg CA group, orally). At the end of the total experiment period of 10 days, blood samples were taken into the serum tube as intracardiac. Vitamin C, cortisol, and leptin levels were determined from serum. It was found that there was no difference between the groups in serum vitamin C, cortisol, and leptin levels in blood samples. As a result, it has been observed that high-dose vitamin C supplements administered orally are not an effective way to increase the vitamin C pool in the body.

**Keywords:** Cortisol, Leptin, Rat, Vitamin C.

\*\*\*

### Sıçanlarda Oral Yüksek Doz Vitamin C Takviyesinin Serum Vitamin C, Leptin ve Kortizol Parametrelerine Etkisi

### ÖZ

Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda yüksek doz aralıklarında oral uygulanan vitamin C takviyesine bağlı olarak vitamin C, kortizol ve leptinin kan düzeylerindeki değişiklikleri belirlemektir. Toplam 21 adet 6-9 aylık yaşta Wistar Albino türü dişi sıçan rastgele olarak grup başına 7 hayvan içerecek şekilde üç gruba ayrıldı. Birinci grup kontrol grubu iken, deney grupları şu şekilde düzenlenmiştir: Vitamin C (1000mg/kg CA grubu, oral yoldan), Vitamin C (3000mg/kg CA grubu, oral yoldan). On günlük toplam deney süresi sonunda kan örnekleri İntrakardiyak olarak serum tüplerine alındı. Serumda vitamin C, kortizol ve leptin düzeyleri belirlendi. Yapılan uygulamaların serum vitamin C, kortizol ve leptin düzeylerine etki etmediği bulundu. Sonuç olarak, oral olarak uygulanan yüksek doz vitamin C takviyesinin vücuttaki C vitamini havuzunu artırmanın etkili yolu olmadığı görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Kortizol, Leptin, Rat, Vitamin C.

To cite this article: Başeğmez M, Eryavuz A. The Effect of Orally High Dose Vitamin C Supplementation on Serum Vitamin C, Leptin and Cortisol Parameters in Rats. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3):339-345

Submission: 23.03.2021 Accepted: 16.08.2021 Published Online: 02.09.2021

ORCID ID; MB: 0000-0002-9994-1251, AE: 0000-0001-8602-2400

\*Corresponding author e-mail: mbasegmez@pau.edu.tr

## GİRİŞ

Vitamin C olarak da bilinen askorbik asit (AA), ilk olarak 1920'lerde skorbut hastalığının önlenmesi ve tedavisindeki rolünü keşfeden Albert von Szent Györgyi tarafından tanımlanan küçük bir karbonhidrat molekülüdür (De Tullio 2010). Vitamin C'nin emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı oldukça karmaşık olup, çoğu düşük moleküler ağırlıklı bileşiklerin aksine bağırsak alımı, doku dağılımı ve böbrek geri alımının büyük bir kısmı sodyuma bağımlı vitamin C taşıyıcı (SVCT) protein ailesi tarafından gerçekleştirilmektedir (Tsukaguchi ve ark. 1999, Wu ve ark. 2008). Diyetle, fizyolojik olarak L-askorbik asit ve L-dehidroaskorbik asit olmak üzere iki ana C vitamini formu bulunmaktadır (Pénicaud ve ark. 2010, Cisternas ve ark. 2014). Bitki ve hayvanların çoğu askorbik asidi D-glikoz veya D-galaktozdan sentezleyebilirlerken, kobaylar, meyve yiyen yarasalar, maymunlar ve insanlar, L-gulonolakton oksidaz enzimi bulunmadığından askorbik asit sentezleyememekte ve günlük diyetle almak zorundadırlar (Naidu 2003). Vitamin C'nin homeostazi; genetik polimorfizmler, gebelik, laktasyon gibi fizyolojik faktörler ile diyet, stres, sigara alışkanlığı gibi çevresel ve yaşam tarzı değişikliklerinden etkilenmektedir (Lykkesfeldt ve Tveden-Nyborg 2019). Bulaşıcı hastalıklar, kanser, kardiyovasküler hastalık, diyabet ve sepsis gibi çok sayıda hastalık durumu da düşük vitamin C alımları ile ilişkilendirilmiştir (Frei ve ark. 2012, Tveden-Nyborg ve Lykkesfeldt 2013). Sağlıklı memelilerin, vitamin C bakımından zengin kaynaklar içermesi koşuluyla, diyet yoluyla yeterli miktarda vitamin C alması mümkün olduğu bildirilse de (Krinsky ve ark. 2000, Carr ve ark. 2013), birçok hastalıkta ve çok düşük vitamin C durumu olan canlılarda diyetle vitamin C alınmasını sağlamanın yetersiz olabileceği de bazı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (Lykkesfeldt ve ark. 2000, Tveden-Nyborg ve Lykkesfeldt 2013, Dachs ve ark. 2014). Levine ve ark. (1996), askorbik asit'in vücutta tutulum veya birikim sağlamayarak fazlasının idrarla hemen atıldığını vurgulayarak, günlük vitamin C alınmasına ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Bu nedenlerle, vücuttaki vitamin C seviyesini korumak için günlük düzenli olarak vitamin C takviyesi yapılması gerektiği öne sürülmektedir (Naidu 2003). Vitamin C takviyelerinin, canlılarda birçok biyolojik işlevinin yanı sıra, vücuttaki miktarına bağlı olarak hastalıkların önlenmesinde etkili olduğu ve daha sağlıklı bir yaşama olanak sağladığı ifade edilmektedir (Du ve ark. 2012, Ward ve ark. 2013, Moores 2013, Malik, 2018, Kalil, 2020). Son yapılan çalışmalarda, C vitamininin yeterince yüksek dozlarda verildiğinde ve kan düzeyi yüksek seviyelere ulaştığında bazı antikanser etkilerinin olduğu öne sürülmektedir (Magri ve ark., 2020). Bu bildirimler, yüksek vitamin C takviyelerinin bazı hastalıkların tedavilerinde umut verici bir yaklaşım önermektedir.

Vitamin C, hem güçlü bir hücre içi antioksidan (Ibrahim ve ark. 2020), hem de geniş biyolojik süreç yelpazesinde steroid hormon sentezine katılarak glukokortikoid biyosentez yolağına katkıda bulunan bir enzimler ko-faktörüdür (Patak ve ark. 2004). Antioksidan rolü, özellikle hem hastalıkların hem de yüksek kirlilik seviyelerinin organizmada yol açtığı oksidatif stresin arttığı durumlarda, vitamin C takviyesini önemli bir seçenek haline getirmektedir (Maeda ve ark. 2020). Son yapılan çalışmalarda C vitamini takviyelerinin insan ve hayvanları; enfeksiyon, zehirlenme, otoimmün hastalıklar ve kanser gelişiminden koruyabilen en ucuz tedavi yöntemlerinden birine aday olduğu gösterilmektedir (Padayatty ve ark. 2003, Aguirre ve May 2008, Ranjan ve ark. 2012, Kuhn ve ark. 2018, Maeda ve ark. 2020, Magri ve ark. 2020). Bununla birlikte, vitamin C takviyelerinin uygulandığı yöntemin (oral, i.m. vb.) de önemli olduğu (Magri ve ark. 2020), oral yapılan takviyelerin bağırsak reseptörleri tarafından kana alınmasında düşük sonuçlara yol açtığı ileri sürülmektedir (Tsukaguchi ve ark. 1999, Rowe ve Carr, 2020). Yapılacak araştırmalardan oral yapılan yüksek doz vitamin C takviyelerinin doku ve organların fizyolojik fonksiyonlarında oluşturduğu etkilere yönelik vitamin C'nin yeni işlevlerinin keşfedilmesi beklenmektedir. Bu nedenle bu çalışma, sıçanlarda farmakolojik doz aralıklarında oral uygulanan vitamin C takviyesine bağlı olarak vitamin C, kortizol ve leptinin kan düzeylerindeki değişikliklerin belirlenmesi amacıyla yapıldı.

## MATERYAL ve METOT

Çalışmada hayvan materyalini Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 6-9 aylık yaşta, 21 adet Wistar Albino türü dişi sıçan (yaklaşık 250-300 g) oluşturdu. Çalışma boyunca hayvanlara yapılacak tüm müdahaleler Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından alınan onay (etik numarası: PAUHADYEK-2020/26) doğrultusunda gerçekleştirildi. Hayvanların bakımı Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapıldı. Hayvanlar oda sıcaklığı ( $22 \pm 1$  °C), bağıl nem (%50-55) ve 12 saat karanlık/aydınlık periyotlarda tutuldu. Sıçanların beslenmesinde standart rat yemi ve içme suyu ad libitum olarak verildi. Çalışmada kullanılacak Vitamin C verilme miktarları daha önce yapılan çalışmalar (Johnston 1999, Brody ve ark. 2002) esas alınarak belirlendi. L (+) ascorbic acid (vitamin C) ticari müstahzarı şeklinde (Dasitgroup, Carlo Erba Reagents, Fransa) temin edildi.

### Vitamin C Solüsyonunun Hazırlanması

Kontrol gruplarına (Grup I) deney süresi boyunca her gün gastrik gavaj yoluyla 1ml % 0.9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonu (POLİFLEKS) uygulaması yapılırken, vitamin C gruplarına deney süresi boyunca

her gün hassas terazi (Tekstar Kd-Tbc 300G 0.001G) ile tartılan L(+) askorbik asid ( Carlo Erba Reagents, 402406 Fransa) % 0.9 luk izotonik sodyum klorür solüsyonu ile karıştırılıp, vorteks (Velp Scientifica ZX3) ile tamamen yüksek devirde içerisinde partikül kalmayacak şekilde çözdürüldükten sonra 1000 mg/kg (Grup II) ve 3000 mg/kg (Grup III)

farmakolojik dozlara denk gelecek şekilde ml bazında 10 gün boyunca gastrik gavaj ile oral olarak verildi. Deneysel aşaması 10 gün olarak yapılan çalışmada hayvanlar rastgele örnekleme metodu ile her grupta 7 sıçan olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Çalışmada gruplara uygulanan yöntem ve deney grupları Tablo 1' de belirtildiği şekilde yapıldı.

**Tablo 1.** Gruplar, gruplardaki hayvan sayıları ve uygulama yöntemi.

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

Gruplar	Gruptaki Hayvan Sayısı	Uygulama Yöntemi
Grup I	7	Kontrol grubu; 1ml %0,9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonu gastrik gavajla uygulandı.
Grup II	7	Vitamin C (1000mg/kg CA) grubu; 1000mg/kg CA karşılık gelecek şekilde vitamin C, 0.9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonunda çözdürülüp ml şeklinde gastrik gavaj ile verildi.
Grup III	7	Vitamin C (3000mg/kg CA) grubu; 3000mg/kg CA karşılık gelecek şekilde vitamin C, 0.9'luk izotonik sodyum klorür solüsyonunda çözdürülüp ml şeklinde gastrik gavaj ile verildi.

### Kan Örneklerinin Alınması

Son uygulamaları takiben 24 saat sonrasında hayvanlardan ksilazin ve ketamin anestezisi altında İntrakardiak olarak serum ayrıştırma tüpüne kan örnekleri alındı. Alınan kan örneklerinin serumları soğutmalı santrifüjde (Hettich Universal 320 R) 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek ayrıştırıldı. Ayrıştırılan serumlar zaman kaybetmeden 1.5 ml'lik ependorf tüplerine alınarak -80 °C de biyokimyasal aşamaya kadar bekletildi.

### Biyokimyasal Analizler

Ependorf tüplerine alınan serum örnekleri, mikroplyt okuyucu (Multiskan Go. Thermo Scientific) ile serum Vitamin C (Bioassay Technology Laboratory marka Kat. No: E0612Ra), serum kortizol (Bioassay Technology Laboratory marka Kat. No: E0828Ra) ve serum leptin (Bioassay Technology Laboratory marka Kat. No: E0561Ra) parametre değerleri ticari rat kitleri kullanılarak belirlendi.

### İstatistiksel Analizler

Araştırmadan elde edilen veriler SPSS 25.0 istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile incelendi. Parametrik test varsayımları sağlandığında bağımsız grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi kullanıldı. Tüm analizlerde  $p < 0.05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### BULGULAR

Çalışmada tüm gruplardan elde edilen serum vitamin C, kortizol ve leptin parametrelerine yönelik veriler Tablo 2'de verildi. Çalışmada farmakolojik doz aralıklarında vitamin C takviyesinin sıçanlarda serum vitamin C, kortizol ve leptin biyokimyasal parametrelerini sayısal açıdan artırsa da gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılığın olmadığı bulundu ( $p > 0.05$ ).

**Tablo 2.** Dişi sıçanlarda 1000 mg/kg ve 3000 mg/kg vitamin C takviyesinin serum vitamin C, kortizol ve leptin parametrelerine etkisi (n=7, mean $\pm$ SE). \*

**Table 2.** The effect of 1000 mg/kg and 3000 mg/kg vitamin C supplementation on serum vitamin C, cortisol, and leptin parameters in female rats (n=7, mean $\pm$ SE).

Parametreler	Kontrol	Vitamin C 1000 mg/kg	Vitamin C 3000 mg/kg
Vitamin C nmol/ml	41,57 $\pm$ 1,54	42,50 $\pm$ 1,17	44,55 $\pm$ 2,21
Kortizol mg/dl	31,40 $\pm$ 0,84	31,40 $\pm$ 1,33	35,12 $\pm$ 1,67
Leptin ng/ml	1,69 $\pm$ 0,04	1,813 $\pm$ 0,04	1,811 $\pm$ 0,05

\*; Aynı satırda gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık yoktur ( $P > 0.05$ ).



## TARTIŞMA

Vitamin C'nin, bazı hormonların salgılanmasında tanımlanmış işlevlere sahip olması ve sodyum bağımlı C vitamini taşıyıcısı (SVCT) 1 ve 2 tarafından gerek bağırsaklardan emilimi gerekse dokular tarafından alınımının ayarlanmasının hormon sentezi için önemli olduğuna yönelik bildirimler (Wu ve ark. 2008) dikkate alınarak yüksek dozda oral vitamin C alınmasının kan kortizol ve leptin düzeylerine etkilerinin belirlendiği bu çalışmada, vitamin C'nin 1000 ve 3000 mg/kg canlı ağırlıktaki dozları kullanılmıştır. Çalışmada; vitamin C takviyelerinin çok yüksek dozlarda bile toksik olmadığı veya sağlık üzerinde ciddi olumsuz etkiler yaratmadığı (Johnston, 1999) ve 3000 mg'a kadar günlük uzun süreli oral takviyelerinin bile güvenli olduğu (Gerster ve Moser 1988, Rivers 1987) bildirimleri dikkate alınarak, sıçanlara toplam 10 gün süren çalışma süresince günde 1000 ve 3000 mg/kg canlı ağırlık düzeyinde vitamin C oral olarak uygulanmıştır.

Çalışmada yüksek doz vitamin C takviyesine rağmen kan vitamin C düzeyinde istatistiksel önemde bir değişikliğin olmaması, vitamin C takviyesinin oral olarak kullanılmasından kaynaklanabilir (Magri ve ark. 2020). Nitekim sağlıklı genç deneklerde yapılan çalışmalarda (Rowe ve Carr, 2020), vitamin C'nin farmakokinetiğinin uygulama yoluna bağlı olarak değiştiği ve oral olarak uygulanmasına göre intra venöz (i.v.) uygulanmasının vitamin C'nin plazmada 100 kat daha yüksek düzeylere ulaşmasına yol açtığı bildirilmektedir. Tsukaguchi ve ark. (1999) tarafından yapılan çalışmada; Na<sup>+</sup> bağımlı C vitamini taşıyıcıları SVCT1 ve SVCT2 olarak izole edilmiş, bu taşıyıcıların doku dağılımını incelendiğinde ise SVCT1'in bağırsakta en bol bulunduğu ve vitamin C'nin en önemli taşıyıcısı olduğu gösterilmiştir. Yüksek doz vitamin C'nin oral takviyelerinin taşıma mekanizmalarının üzerinde zararlı etki oluşturarak emilim yüzdesinde düşüşe neden olduğu birçok yazar tarafından belirtilmiştir (Horning ve ark. 1980, Levine ve ark. 1996, Graumlich ve ark. 1997). Ayrıca yüksek doz vitamin C kullanımının, bağırsak epitel hücre zarının apikal yüzeyinde SVCT1 ekspresyonunda güçlü bir azalışa sebep olması (MacDonald ve ark. 2002), yüksek doz vitamin C takviyelerinin göreceli verimsizliğini açıklarken, C vitamininin biyoyararlanımını sınırlayan ana faktörün bağırsaktan emilimi olduğu tezini de desteklemektedir. Chen ve ark. (2005), vitamin C takviyesinde farmakolojik plazma konsantrasyonlarına oral alımın aksine, çoğunlukla intravenöz infüzyon olmak üzere parenteral uygulama ile ulaşılabilirliğini bildirmektedirler. Sonuç olarak, sağlıklı deneklerde oral verilen vitamin C takviyelerinin bağırsaklardan emiliminin düşük olması nedeniyle kan düzeylerini de etkileyebilmektedir (Rowe ve Carr, 2020). Çalışmada elde edilen bulgu, diyetle yeterli düzeyde vitamin C

alan sıçanlara vitamin C'nin yüksek dozlarda oral uygulanmasının kan vitamin C düzeyini etkilemeyeceğine ve fizyolojik etkilerin oluşmasına katkı sağlamayacağına işaret etmektedir.

Dokular, C vitamini içeriği bakımından büyük farklılıklar gösterse de hipofiz, böbrek üstü bezi ve gonadlar gibi hormon sentezi yapan dokularda yüksek düzeylerde vitamin C bulunmaktadır (Das ve ark. 1993). Bu tür endokrin dokulardaki yüksek vitamin C düzeyleri, hormon sentezindeki önemini kanıtlamaktadır. Adrenal bezden kortizolün sentezlenmesi için vitamin C'ye gereksinim olduğu bilinmektedir (Levine ve Morita, 1985). Bu nedenle, vitamin C sağlamak hem antioksidan sistemde hem de adrenal bezlerde kortizol sentezinde değişiklikler yaparak gerek oksidatif strese gerekse bağırsıklık tepkisinde değişiklikler yapabilir. Strese yanıt olarak adrenal bezler tarafından üretilen önemli bir glukokortikoid olan kortizol, organizmadaki birçok fizyolojik süreçlerde rol oynamaktadır (Sheibani ve ark. 2021).

Yüksek vitamin C alımının canlılarda kortizol sekresyonu üzerindeki nihai etkisine dair tartışmalı literatürler bulunmaktadır (Mourot ve ark. 1992, Zhou ve ark. 2003). Daha önce domuz ve kanatlılarda yapılan çalışmalarda (Wariss 1979, Mourot ve ark. 1992), vitamin C takviyesinin plazma kortizol düzeylerini düşürdüğü bildirimlerinin aksine, bu çalışmada; yüksek düzeylerde vitamin C'nin oral takviyesinin kan kortizol düzeylerine etki etmemesi, Pion ve ark. (2004)'nın domuzlarda vitamin C takviyesinin kan kortizol düzeyi üzerinde etkisi olmadığı yönündeki bildirimlerini destekler niteliktedir. Benzer şekilde, bu çalışmadaki bulgular; vitamin C takviyesinin adrenokortikotropik hormon (ACTH) tarafından indüklenen kortizol sentezi üzerinde hiçbir etkisi olmadığı (Montalvo ve ark. 2011), günde 3000 mg C vitamininin oral almanın akut psikolojik strese yanıt verdikten sonra kortizolün daha hızlı iyileşmesine yol açarak, hormonun genel konsantrasyonunu azaltmadığı (Brody ve ark. 2002) ve 0-10.000 mg/kg aralığında C vitamini takviyeli diyetle beslenen kaplumbağa grupları arasında serum kortizol düzeylerinin etkilenmediği (Zhou ve ark. 2003) yönündeki bildirimlerle uyumluydu. Bununla birlikte, endojen vitamin C sentezi bulunmayan kobaylarda skorbüt hastalığı gelişimi esnasında adrenal vitamin C düzeylerinde hızlı bir düşüş meydana geldiği ve bunu plazma kortizol seviyesinde artışın izlediği kaydedilmiştir (Douglas ve ark.1987). Avcı ve ark. (2008)'ının nakil işlemine tabi tutulan koyunlarda yaptıkları çalışmada; nakil işleminin oluşturduğu strese bağlı olarak kan kortizol düzeyinin arttığını ancak hayvanlara i.m. vitamin C enjeksiyonu yapılması halinde nakil işlemi sonrası kan kortizol düzeylerinde önemli bir azalmanın olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu durum transport sürecinde canlıda stres oluşturacak çevresel ve fizyolojik değişikliklerin plazma ACTH ve kortizol

salınmasında meydana gelen artış ile ilişkilendirilmiştir (Avcı ve ark. 2008). Benzer şekilde Olayaki ve ark. (2015), C vitamini ile tedavi edilen hem akut hem de kronik uykudan yoksun sıçanlarda gözlenen plazma kortizol düzeylerindeki önemli derecede düşüşün, C vitamininin stres yanıtını hafifletme kabiliyetine bağlı olduğu gösterilmiştir. Vitamin C takviyesinin kan kortizol düzeyleri bakımından çalışmalar arasında gözlenen farklılıkların vitamin C takviyesinin yapılma şeklindeki (oral ya da i.m.) farklılıklar (Rowe ve Carr, 2020) ile denemede kullanılan hayvanlarda stres oluşturacak (psikolojik, nakil vb.) faktörlerden (Brody ve ark. 2002, Avcı ve ark. 2008, Olayaki ve ark., 2015) kaynaklandığı söylenebilir.

Kanda vitamin C düzeyinin düşük olmasının; vücut yağı, abdominal yağ ve bel/boy oranının yükselmesi ile ilişkisinin bulunduğu öne sürülmektedir (Garcia-Diaz ve ark. 2014). Daha önce yapılan çalışmalarda (Garcia ve ark. 2012, Garcia-Diaz ve ark. 2014), insanlarda hipovitamin C ile obezite arasında bir ilişkinin bulunduğu ve bu nedenle obezite ve stres gibi sağlığı etkileyen yönleri de dahil olmak üzere C vitamini durumu ve gereksinimlerini etkileyen çok sayıda faktörün olduğu kaydedilmektedir. Adipositler tarafından salınan ve enerji alımı ve harcanmasını düzenlemede önemli bir rol oynayan peptid yapıdaki leptin hormonu, beyindeki tokluk merkezini uyarak obeziteyi inhibe edebilmektedir (Jamalan ve ark. 2015). Nitekim, yağ dokudan salgılanan leptin hormonunun kan düzeylerinin vitamin C takviyelerinden etkilendiği ve hem insan hem de hayvan modellerinde leptin ekspresyonunu inhibe ettiği ileri sürülmektedir (Garcia-Diaz ve ark. 2010). Bu çalışmada yüksek düzeyde oral vitamin C takviyelerinin kan leptin düzeyinde herhangi bir etki doğurmamasının nedeni, hayvanların sağlıklı ve stres oluşturacak herhangi bir etkiye maruz kalmamış olmalarından ve vitamin C'nin uygulama şeklinden kaynaklanabilir. Nitekim, bu çalışmada kan vitamin C düzeylerinin uygulamalardan etkilenmemiş olması, yağ dokuda leptin ekspresyonunu inhibe edecek kan düzeyine ulaşmamış olmasına yol açmış olabilir. Vitamin C takviyelerinin farklı uygulama yolları ile yapılacak yeni çalışmalarla, hangi uygulama şeklinin kan leptin düzeyini azaltmada daha etkili olduğu ortaya çıkartılabilir.

## SONUÇ

Aynı bakım ve besleme şartlarına sahip 6-9 aylık Wistar Albino dişi sıçanlarda yapılan bu çalışmada elde edilen bulgularda, hem 1000 mg/kg hem de 3000 mg/kg oral vitamin C takviyesinin vitamin C, kortizol ve leptinin kan düzeylerine etkisinin olmadığı saptandı. Bu durum sıçanlara yüksek doz C vitamini takviyelerinin oral olarak alınmasının vücuttaki C vitamini havuzunu artırmanın etkili bir yolu olmadığını ve diyet yükünü büyük ölçüde artıracığını göstermektedir. Bu alanda farklı

yaşlarda, cinsiyetlerde, dozlarda ve değişik verilmiş yollarında yapılacak yeni araştırmalarla, vitamin C takviyesinin organ ve dokuların fizyolojik fonksiyonlarına yaptığı katkılarının daha iyi anlaşılması sağlanabilir. Çalışmada vitamin C'nin yüksek dozlarda oral takviyesinin etkilerine yönelik elde edilen bulguların, vitamin C'nin insan ve hayvanlarda günlük alınması gereken düzeyinin belirlenmesiyle ilgili yapılacak yeni çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Etik Kurul Bilgileri:** Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 13.08.2020 tarihli PAUHDEK-20/26 sayılı Araştırma onayıyla etik kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

## KAYNAKLAR

- Aguirre R, May JM.** Inflammation in the vascular bed: importance of vitamin C. *Pharmacology & therapeutics.* 2008; 119(1), 96-103.
- Avcı G, Küçükkurt İ, Fidan AF, Eryavuz A, Aslan R, Dündar Y.** Nakil işlemine tabi tutulan koyunlarda vitamin C ve ksilazin uygulamasının kortizol ve lipid peroksidasyon ile bazı biyokimyasal parametrelere etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi.* 2008; 22(3), 147-152.
- Brody S, Preut R, Schommer K, Schürmeyer TH.** A randomized controlled trial of high dose ascorbic acid for reduction of blood pressure, cortisol, and subjective responses to psychological stress. *Psychopharmacology.* 2002; 159(3), 319-324.
- Carr AC, Bozonet SM, Pullar JM, Simcock JW, Vissers M.** A randomized steady-state bioavailability study of synthetic versus natural (kiwifruit-derived) vitamin C. *Nutrients.* 2013; 5(9), 3684-3695.
- Chen Q, Espey MG, Krishna MC, Mitchell JB, Corpe CP, Buettner GR, Levine M.** Pharmacologic ascorbic acid concentrations selectively kill cancer cells: action as a pro-drug to deliver hydrogen peroxide to tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2005; 102(38), 13604-13609.
- Cisternas P, Silva-Alvarez C, Martínez F, Fernandez E, Ferrada L, Oyarce K, Nualart F.** The oxidized form of vitamin C, dehydroascorbic acid, regulates neuronal energy metabolism. *Journal of neurochemistry.* 2014; 129(4), 663-671.
- Dachs GU, Munn DG, Carr AC, Vissers MC, Robinson BA.** Consumption of vitamin C is below recommended daily intake in many cancer patients and healthy volunteers in Christchurch. *NZ Med J.* 2014; 127(1390), 73-6.
- Das PC, Das KP, Bagchi K, Dey CD.** Evaluation of tissue ascorbic acid status in different hormonal states of female rat. *Life Sci.* 1993; 52:1493-1498.
- De Tullio MC.** The mystery of vitamin C. *Nat. Educ.* 2010; 3(9), 48.
- Doulas NL, Constantopoulos A, Litsios B.** Effect of ascorbic acid on guinea pig adrenal adenylate cyclase activity and plasma cortisol. *The Journal of nutrition.* 1987; 117(6), 1108-1114.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR.** Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer.* 2012; 1826(2), 443-457.

- Frei B, Birlouez-Aragon I, Lykkesfeldt J.** Authors' perspective: what is the optimum intake of vitamin C in humans?. *Critical reviews in food science and nutrition.* 2012; 52(9), 815-829.
- Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Boque N, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA.** Vitamin C inhibits leptin secretion and some glucose/lipid metabolic pathways in primary rat adipocytes. *Journal of Molecular Endocrinology.* 2010; 45(1), 33-43
- Garcia-Diaz DF, Lopez-Legarrea P, Quintero P, Martinez JA.** Vitamin C in the treatment and/or prevention of obesity. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 2014; 60(6), 367-379.
- García OP, Ronquillo D, del Carmen Caamaño M, Camacho M, Long KZ, Rosado JL.** Zinc, vitamin A, and vitamin C status are associated with leptin concentrations and obesity in Mexican women: results from a cross-sectional study. *Nutrition & Metabolism.* 2012; 9(1), 59.
- Gerster H, Moser U.** Is high-dose vitamin C intake associated with systemic conditioning? *Nutrition Research.* 1988; 8(11), 1327-1332.
- Graulich JF, Ludden TM, Conry-Cantilena C, Cantilena LR Jr, Wang Y, Levine M.** Pharmacokinetic model of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion. *Pharmaceutical Research.* 1997; 14, 1133-1139.
- Hornig D, Vuilleumier JP, Hartmann D.** Absorption of large, single, oral intakes of ascorbic acid. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research.* 1980; 50, 309-314.
- Ibrahim RE, Ahmed SA, Amer SA, Al-Gabri NA, Ahmed AI, Abdel-Warith AWA, Metwally AE.** Influence of vitamin C feed supplementation on the growth, antioxidant activity, immune status, tissue histomorphology, and disease resistance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Reports.* 2020; 18, 100545.
- Jamalan M, Rezazadeh M, Zeinali M, Ghaffari MA.** Effect of ascorbic acid and alpha-tocopherol supplementations on serum leptin, tumor necrosis factor alpha, and serum amyloid A levels in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Avicenna journal of phytomedicine.* 2015; 5(6), 531.
- Johnston CS.** Biomarkers for establishing a tolerable upper intake level for vitamin C. *Nutrition reviews.* 1999; 57(3), 71-77.
- Kalil AC.** Lack of Benefit of High-Dose Vitamin C, Thiamine, and Hydrocortisone Combination for Patients With Sepsis. 2020; *JAWA*, 323; 419-420.
- Krinsky NI, Beecher GR, Burk RF, Chan AC, Erdman JJ, Jacob RA, Prentice RL.** Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. *Institute of Medicine.* 2000.
- Kuhn SO, Meissner K, Mayes LM, Bartels K.** Vitamin C in sepsis. *Current opinion in anaesthesiology.* 2018; 31(1), 55.
- Levine M, Conry-Cantilena C, Wang Y, Welch RW, Washko PW, Dhariwal KR, Cantilena LR.** Vitamin C pharmacokinetics in healthy volunteers: evidence for a recommended dietary allowance. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996; 93(8), 3704-3709.
- Levine M, Morita K.** Ascorbic acid in endocrine systems. *Vitam Horm.* 1985; 42:1-64
- Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P.** The pharmacokinetics of vitamin C. *Nutrients.* 2019; 11(10), 2412.
- Lykkesfeldt J, Christen S, Wallock L M, Chang HH, Jacob RA, Ames BN.** Ascorbate is depleted by smoking and repleted by moderate supplementation: a study in male smokers and nonsmokers with matched dietary antioxidant intakes. *The American journal of clinical nutrition.* 2000; 71(2), 530-536.
- MacDonald L, Thumser AE, Sharp P.** Decreased expression of the vitamin C transporter SVCT1 by ascorbic acid in a human intestinal epithelial cell line. *Br. J. Nutr.* 2002; 87, 97-100.
- Maeda J, Allum AJ, Mussallem JT, Froning CE, Haskins AH, Buckner MA, Kato TA.** Ascorbic acid 2-glucoside pretreatment protects cells from ionizing radiation, UVC, and short wavelength of UVB. *Genes.* 2020; 11(3), 238.
- Magri A, Germano G, Lorenzato A, Lamba S, Chila R, Montone V, Amadio V, Ceruti T, Sassi F, Areno S, Abrignani S, D'incalci M, Zucchetti M, Nicolantino F, Bardelli A.** High-dose vitamin C enhances cancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* 2020 12 (532).
- Malik EP.** Hydrocortisone, Ascorbic Acid and Thiamine (HAT Therapy) for the Treatment of Sepsis. *Focus on Ascorbic Acid. Nutrients.* 2018; 10 (11); 1762.
- Montalvo CP, Díaz NH, Galdames LA, Andrés ME, Larrain RE.** Effect of vitamins E and C on cortisol production by bovine adrenocortical cells in vitro. *Journal of dairy science.* 2011; 94(7), 3495-3497.
- Moore J.** Vitamin C: a wound healing perspective. *British journal of community nursing.* 2013; 18(Sup12), S6-S11.
- Mourot J, Peiniau P, Aumaitre A, Chevillon P.** Effect of dietary vitamin C supplementation on growth performance and meat quality in Large White or Large White × Pietrain pigs. *J. Rech. Porc France.* 1992; 24:55-64.
- Naidu KA.** Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. *Nutrition journal.* 2003; 2(1), 7.
- Olayaki LA, Sulaiman SO, Anoba NB.** Vitamin C prevents sleep deprivation-induced elevation in cortisol and lipid peroxidation in the rat plasma. *Nigerian Journal of Physiological Sciences.* 2015; 30(1-2), 5-9.
- Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Levine M.** Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American college of Nutrition.* 2003; 22(1), 18-35.
- Patak P, Willenberg HS, Bornstein SR.** Vitamin C is an important cofactor for both adrenal cortex and adrenal medulla. *Endocrine research.* 2004; 30(4), 871-875.
- Pénicaud C, Peyron S, Bohuon P, Gontard N, Guillard V.** Ascorbic acid in food: Development of a rapid analysis technique and application to diffusivity determination. *Food Research International.* 2010; 43(3), 838-847.
- Pion SJ, Van Heugten E, See MT, Larick DK, Pardue S.** Effects of vitamin C supplementation on plasma ascorbic acid and oxalate concentrations and meat quality in swine. *Journal of animal science.* 2004; 82(7), 2004-2012.
- Ranjan R, Ranjan A, Dhaliwal GS, Patra RC.** L-Ascorbic acid (vitamin C) supplementation to optimize health and reproduction in cattle. *Veterinary Quarterly.* 2012; 32(3-4), 145-150.
- Rivers JM.** Safety of high-level vitamin C ingestion. *Ann NY Acad Sci.* 1987; 498, 445-454.
- Rowe S, Carr AC.** Global Vitamin C Status and Prevalence of Deficiency: A Cause for Concern? *Nutrients.* 2020; 12(7), 2008.
- Sheibani S, Capua L, Kamaei S, Akbari SSA, Zhang J, Guerin H, Ionescu AM.** Extended gate field-effect-transistor for sensing cortisol stress hormone. *Communications materials.* 2021; 2(1), 1-10.
- Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Hediger MAA** family of mammalian Na<sup>+</sup>-dependent L-ascorbic acid transporters. *Nature.* 1999; 399(6731), 70-75.

- Tveden-Nyborg P ve Lykkesfeldt J.** Does vitamin C deficiency increase lifestyle-associated vascular disease progression? Evidence based on experimental and clinical studies. *Antioxidants & redox signaling*. 2013; 19(17), 2084-2104.
- Ward MS, Lamb J, May JM, Harrison FE.** Behavioral and monoamine changes following severe vitamin C deficiency. *Journal of neurochemistry*. 2013; 124(3), 363-375.
- Wariss PD.** Adrenal ascorbic acid depletion as an index of preslaughter stress in pigs. *Meat Sci*. 1979; 3:281–285.
- Wu X, Iguchi T, Itoh N, Okamoto K, Takagi T, Tanaka K, Nakanishi T.** Ascorbic Acid Transported by Sodium-Dependent Vitamin C Transporter 2 Stimulates Steroidogenesis in Human Choriocarcinoma Cells. *Endocrinology*. 2008; 149; 73-83.
- Zhou X, Xie M, Niu C, Sun R.** The effects of dietary vitamin C on growth, liver vitamin C and serum cortisol in stressed and unstressed juvenile soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2003; 135(2), 263-270.

## Bupropion Improves Biochemical Parameters of Ethanol Exposure in Rats

Ali TÜREYEN

*Department of Gastroenterology, Ministry of Health Eskisehir City Hospital, Eskisehir, Turkey*

### ABSTRACT

Today, alcohol intake is a significant factor in many diseases primarily digestive system disorders. Despite dopamine agonists for helping to heal on alcohol-induced damages was known, the effects of bupropion on ethanol-induced varying biochemical parameters were not clarified completely. This study was conducted to assess the effects of bupropion on some changing biochemical parameters due to ethanol treatment. Rats were administered with 56% ethanol twice a week for four weeks and then bupropion was orally administered in doses of 30 and 60 mg/kg for 7 days. At the end of the study, it was found that bupropion reversed the values of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), urea, creatinine, total protein, and glucose changed by ethanol. Study findings proved that bupropion improved effectively the changed biochemical parameters due to alcohol administration.

**Keywords:** Biochemical parameters, bupropion, ethanol, rat

\*\*\*

### Bupropion Etanole Maruz Kalan Ratlarda Biyokimyasal Parametreleri İyileştirir

### ÖZ

Günümüzde alkol alımı sindirim sistemi hastalıkları başta olmak üzere birçok hastalığın önemli bir etkenidir. Dopamin agonistlerinin alkol kaynaklı hasarlar üzerinde iyileşmeye yardımcı olduğunun bilinmesine karşın, bupropionun etanol kaynaklı değişen biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu çalışma etanol uygulaması ile değişen bazı biyokimyasal parametreler üzerinde bupropionun etkisini değerlendirmek için gerçekleştirildi. Çalışmada ratlara haftada iki kez dört hafta süreyle % 56 etanol uygulaması yapıldı ve sonrasında bupropion 30 ve 60 mg/kg dozlarında yedi gün süreyle oral olarak uygulandı. Çalışma sonunda bupropionun etanol ile değişen aspartat aminotransferaz (AST), alanin aminotransferaz (ALT), alkalın fosfataz (ALP), üre, kreatinin, total protein ve glukoz değerlerini tersine çevirdiği belirlendi. Çalışma bulguları alkol uygulaması ile değişen biyokimyasal parametreleri bupropionun etkili bir şekilde iyileştirdiğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyokimyasal parametreler, bupropion, etanol, rat

---

To cite this article: Türeya A. Bupropion Improves Biochemical Parameters of Ethanol Exposure in Rats. Kocatepe Vet J. (2021)14(3):346-350

Submission: 17.06.2021 Accepted: 26.08.2021 Published Online: 02.09.2021

ORCID ID: AT: 0000-0001-8991-720X

\*Corresponding author e-mail: alitureyen67@gmail.com

---

## INTRODUCTION

Alcohol consumption causes damages on various tissues primarily upper parts of digestive system and liver (Aihara et al. 2003; Behrman, 2005). Continuous and excessive alcohol intake increases permeability of intestinal mucosa and produces excessive acetaldehyde that is a reactive ethanol metabolite (Fisher et al. 2010). Despite biochemical parameter indicators such as serum gamma glutamyl transferase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and erythrocyte mean cell volume (MCV) entailing limiting accuracy they were used in diagnosis of alcohol consumption (Sharpe et al. 1996). Moreover, it was reported in experimental study that biochemical parameters associated with alcohol intake went out of normal levels (Hamed 2011, Ozbayer et al. 2014).

It was reported that antidepressant medicines used to treat psychiatric illnesses successfully prevent some alcohol induced diseases (Andersen 1984, Shrivastava et al. 1985). Bupropion is a medicine blocks dopamine and noradrenalin reuptake and has non-competitive antagonistic effect to central nicotinic acetylcholine receptors. Besides using depression treatment, it was reported that bupropion helps to treat ulcer (Dedeoğlu et al. 2011). But, a study that shows the effect of bupropion on biochemical parameters was not found. For this reason, it was aimed to determine the effect of bupropion on biochemical parameters in alcohol administered rats.

## MATERIAL and METHODS

Bupropion HCl used in study was purchased from GlaxoSmithKline (Istanbul, Turkey), and ethanol of 98% high purity from Sigma-Aldrich (MO, USA). Other chemicals, at high purity, to be used to determine parameters of analysis were purchased from commercial companies.

In this study, 2 months (180-200 g) 24 Sprague Dawley male rats were obtained from Afyon Kocatepe University Experimental Animal Application and Research Centre. During experiment, treatments applied to animals were conducted in accordance with universal ethical principles and by the approval of Afyon Kocatepe University Experimental Animal Local Ethics Committee (Ethical number: 49533702/76). Care and feeding of the rats were conducted at  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  room

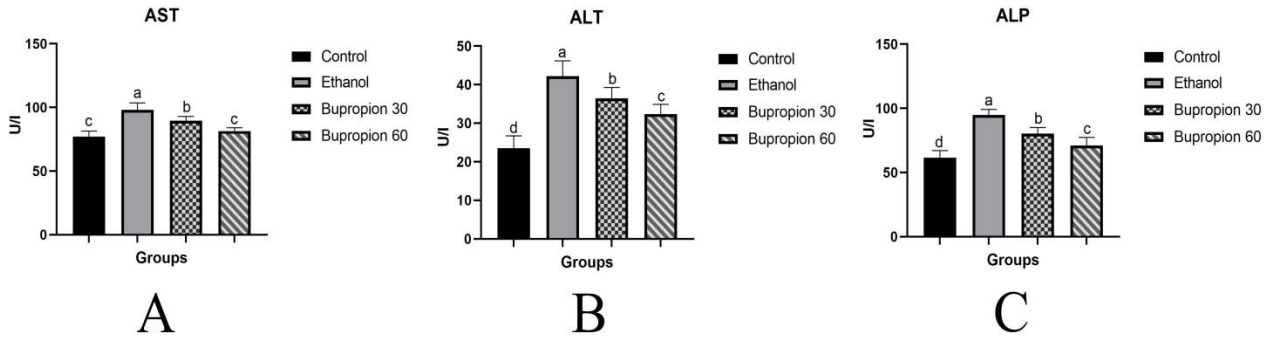
temperature, 55-60% humidity and with a photoperiod of 12:12 hours. The rats in working group were fed with standard rodent and fresh drinking water ad libitum. Moreover, animals were kept without food before 24 hours of alcohol treatment.

Ethanol (Ji et al. 2019) and bupropion (Abuhashish et al. 2015) doses to be used in experimental phase were determined in accordance with the study conducted as before. Animals were divided as control group, alcohol group, group treated with 30 mg/kg bupropion and group treated with 60 mg/kg bupropion, into 4 groups each consisting of 6 male rats. After fasting of 12 hours, rats were administered orally with 56% (8 g/kg) ethanol two times a week. Normal and model groups were also orally administered with physiological saline water following same protocol. After four weeks, bupropion was administered once a day, over a seven days period and after 2 hours of last administration animals were taken under general anaesthesia with isoflurane and necessary blood samples were collected. To obtain plasma from blood samples, blood was centrifuged at 600 g for 15 minutes. After centrifuge the plasma obtained were stored until they were analysed at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

In order to determine the values of biochemical parameters AST, ALT, ALP, total protein, glucose, blood urea (BUN), and creatinine the kits purchased from commercial companies (Human Diagnostics, Wiesbaden, Germany) and visible spectrophotometer (Tokyo, Japan) to measure these parameters were used.

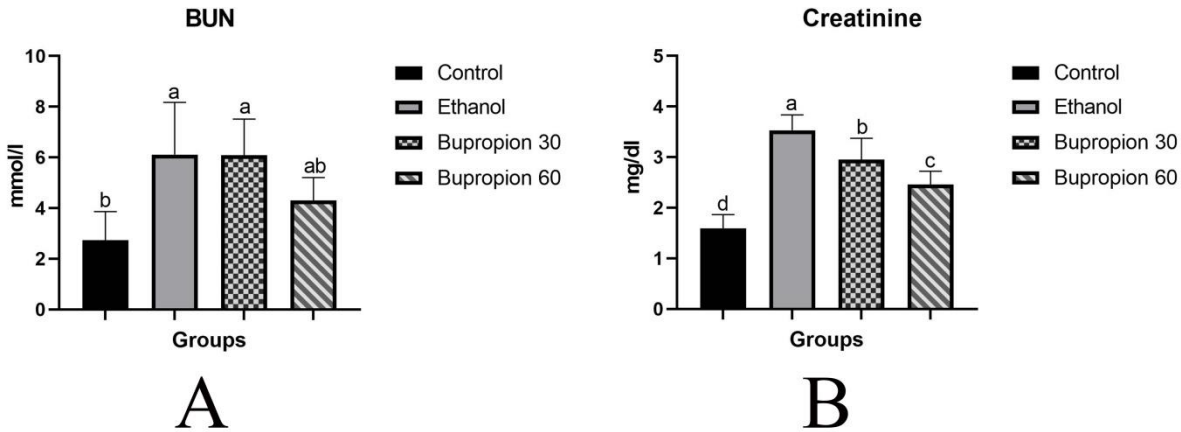
## RESULTS

It was found that in rats administered with ethanol the plasma AST, ALT, and ALP levels were higher compared with control group, on the other hand levels were decreased compared with alcohol group depending on increased bupropion treatment ( $p < 0.001$ ; Figure 1A-C). It was found that, plasma total protein ( $p < 0.01$ ; Figure 3B) in animals administered with ethanol levels were decreased compared with control group, on the other hand the levels of BUN ( $p \leq 0.001$ ; Figure 2A), creatinine ( $p < 0.001$ ; Figure 2B) and glucose ( $p < 0.001$ ; Figure 3A) were increased. It was found that these values were decreased in groups administered with bupropion depending on increased dose compared with alcohol group and approximated to control.



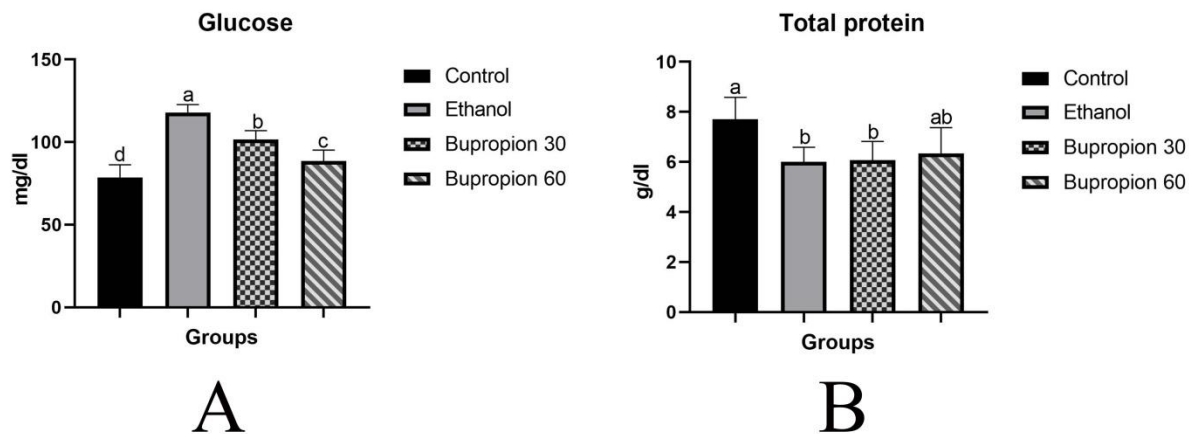
**Şekil 1:** Alkol ile 30 ve 60 mg/kg dozda bupropionun ratlara uygulamasının AST, ALT ve ALP düzeyleri üzerine etkisi. Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. *a,b,c,d*: farklı harfleri taşıyan gruplar arasında önemlilik bulunmaktadır.

**Figure 1:** The effect on AST, ALT, and ALP levels of bupropion administration in rats administered with alcohol in doses of 30 and 60 mg/kg. Data were expressed as average  $\pm$  standard deviation. *a,b,c,d*: the differences among groups bearing different letters are significant.



**Şekil 2:** Alkol ile 30 ve 60 mg/kg dozda bupropionun ratlara uygulamasının BUN ve kreatinin düzeyleri üzerine etkisi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. *a,b,c,d*: farklı harfleri taşıyan gruplar arasında önemlilik bulunmaktadır.

**Figure 2:** The effect on BUN and creatinine levels of bupropion administration in rats administered with alcohol in doses of 30 and 60 mg/kg. Data were expressed as average  $\pm$  standard deviation. *a,b,c,d*: the differences among groups bearing different letters are significant.



**Şekil 3:** Alkol ile 30 ve 60 mg/kg dozda bupropionun ratlara uygulamasının glukoz ve total protein düzeyleri üzerine etkisi. Veriler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edilmiştir. <sup>a,b,c,d</sup>: farklı harfleri taşıyan gruplar arasında önemlilik bulunmaktadır.

**Figure 3:** The effect on glucose and total protein levels of bupropion administration in rats administered with alcohol in doses of 30 and 60 mg/kg. Data were expressed as average  $\pm$  standard deviation. <sup>a,b,c,d</sup>: the differences among groups bearing different letters are significant.

## DISCUSSION

Investigations made reveals that high exposure to alcohol increases the AST and ALT levels in blood (Halvorson et al. 1993). One of two enzymes ALT is more specific measure of alcohol induced liver damage. Because ALT is located primarily in liver while AST is found in various organs including heart, muscle, kidney, and brain. Very high levels of these enzymes (for example, 500 unit per liter) may indicate alcoholic liver disease (Peterson, 2004). When some experimental alcohol administration studies were investigated; it was reported that, following single dose of 10 mg/kg ethanol administration to rats significant increase in alcohol dehydrogenase level in blood and in AST, ALT and lactate dehydrogenase (LDH) enzyme activities was found (Hamed, 2011). In another study conducted similarly, it was reported that single dose of 75% ethanol (2.5 ml/kg) administration in rats increased serum AST, ALT and LDH levels (Ozbayer et al. 2014). In the study, it was found that, significant increase in AST, ALT and ALP levels in rats administered with ethanol was found and bupropion administration decreased these levels with increased alcohol administration. In the study conducted in line with other studies, this case shows that bupropion reduces negative effects of alcohol primarily on liver and other organs.

It was reported that, in the study where the urea synthesis, alanine elimination were investigated for the rats administered with acute low dose of (8-14 mmol/l, i.v.) ethanol and nitrogen conversion was investigated for satiated and fasted rats, the blood urea quantity was decreased in both cases (Jensen et

al. 1991). In contrary to this, it was reported that, in the study where ethanol was given to rats in different concentrations (5, 8, 10, and 12 g/kg) for once a week, BUN and creatinine values were increased after four weeks (Tahir and Sultana 2011). Also, in this study, it was found that BUN and creatinine levels were increased and bupropion administrations reduced these increased levels. The increase in BUN and creatinine levels may be depend on these cytosolic enzymes to leak into circulatory system by the alteration of membrane permeability due to liver and kidney damage during ethanol administration. Bupropion potentially may have reduced these values by contributing to protection of cellular membrane integrity in tissues and preventing tissue damage.

Despite it is widely known that gluconeogenesis is suppressed by the ethanol the effect of alcohol intake on the blood glucose levels is controversial. Ethanol may have effect on liver both for glucose production and glucose consumption (Mokuda et al. 2004). In the study where the effects of ethanol on the glucose transporters (GLUT) and glucose use in rat brain were investigated the rats were given 3 g/kg ethanol before 4 hours of removal of cerebral cortical tissue and a decrease in GLUT number and protein content was observed in rats given ethanol compared with control group (Handa et al. 2000). Moreover, it was reported that as a result of short and long term ethanol exposure blood glucose concentrations, glucose intolerance and insulin resistance was increased and chronic alcohol consumption is an independent risk factor for type 2 diabetes development in some populations (Fowman 1988, Rachdaoui et al. 2003). In the study, it was observed



that glucose level was increased in groups administered with alcohol; on the other hand the increased level was reduced by bupropion administration. This situation may happen from regulatory effect of bupropion on glucose metabolism (Costello et al. 2010) and/or insulin secretion (el-Dakhkhny et al. 1996). It was reported that ethanol administration reduced serum total protein and albumin quantity, this case was resulted from decreased liver functionality depending on alcohol intake (Ahmed et al. 2002, Saravanan et al. 2006). In similar way, it was reported that, ethanol administration caused decrease in total protein quantity, an increase in total protein level was observed, even not statistically significant in rats administered with bupropion compared with alcohol group. This situation may be resulted from the improvement of stabilization of blood protein levels by bupropion administration and additionally of functional status of liver cells.

As a result, it was found that biochemical parameters have exceeded normal limits in rats administered with ethanol for four weeks, these parameters that were changed with alcohol approached to run their normal course by the bupropion administrations in doses of 30 and 60 mg/kg. We reached the conclusion that, the bupropion in addition to using as antidepressant may reduce alcohol induced tissue damage and it would be beneficial to consider this case in therapeutic approach.

**Ethics Committee Information:** The study was approved by Afyon Kocatepe University Ethics Committee (Ethical number: 49533702/76).

**Conflict of interest:** The author has declared that no competing interest exists.

## REFERENCES

- Abuhashish HM, Ahmed MM, Al-Rejaie SS, Eltahir KE.** The antidepressant bupropion exerts alleviating properties in an ovariectomized osteoporotic rat model. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(2):209-20.
- Ahmed B, Alam T, Varshney M, Khan SA.** Hepatoprotective activity of two plants belonging to the Apiaceae and the Euphorbiaceae family. *J Ethnopharmacol.* 2002 Mar;79(3):313-6.
- Aihara T, Nakamura E, Amagase K, Tomita K., Fujishita F, Furutani K, Okabe S.** Pharmacological control of gastric acid secretion for the treatment of acid-related peptic disease: past, present, and future. *Pharmacol. Therap.* 2003; 98(1):109-27.
- Andersen O, Bergsaker-Aspoy J, Halvorsen L, Giercksky K.** Doxepin in the treatment of duodenal ulcer. A double-blind clinical study comparing doxepin and placebo. *Scand J Gastroenterol.* 1984; 19:923-925.
- Behrman SW.** Management of complicated peptic ulcer disease. *Arch Surg.* 2005; 140(2):201-208.
- Costello MR, Mandelkern MA, Shoptaw S, Shulenberg S, Baker SK, Abrams AL, Xia C, London ED, Brody AL.** Effects of treatment for tobacco dependence on resting cerebral glucose metabolism. *Neuropsychopharmacology.* 2010 Feb;35(3):605-12. .
- Dedeoğlu E, Bayram B, Kıziler AU, Dedeoğlu B.** Generalized tonic-clonic seizure induced by the extended-release bupropion hydrochloride formulation. *Bulletin Clinical Psychopharm.* 2011; 21(4), 362-363.
- El-Dakhkhny M, Abdel el-Latif HA, Ammon HP.** Different effects of the antidepressant drugs imipramine, maprotiline and bupropion on insulin secretion from mouse pancreatic islets. *Arzneimittelforschung.* 1996 Jul;46(7):667-9.
- Fisher SJ, Swaan PW, Eddington ND.** The ethanol metabolite acetaldehyde increases paracellular drug permeability in vitro and oral bioavailability in vivo. *J Pharm Exp Therap.* 2010; 332(1), 326-333.
- Fowman DT.** The effect of ethanol and its metabolites on carbohydrate, protein and lipid metabolism. *Ann Clin Lab Sci.* 1988;18: 181-189.
- Halvorson MR, Campbell JL, Sprague G, Slater K, Noffsinger JK, Peterson CM.** Comparative evaluation of the clinical utility of three markers of ethanol intake: the effect of gender. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993;17(2):225-9.
- Hamed MA.** Metabolic Profile of Rats after One Hour of Intoxication with a Single Oral Dose of Ethanol. *J Pharm Toxicol.* 2011; 6:158-165.
- Handa RK, DeJoseph MR, Singh LD, Hawkins RA, Singh SP.** Glucose transporters and glucose utilization in rat brain after acute ethanol administration. *Metab Brain Dis.* 2000; 15(3):211-22.
- Jensen SA, Almdal TP, Vilstrup H.** Acute in vivo effects of low ethanol concentration on the capacity of urea synthesis in rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 1991;15(1):90-3.
- Ji W, Liang K, An R, Wang X.** Baicalin protects against ethanol-induced chronic gastritis in rats by inhibiting Akt/NF- $\kappa$ B pathway. *Life Sci.* 2019; 239, 117064.
- Mokuda O, Tanaka H, Hayashi T, Ooka H, Okazaki R, Sakamoto Y.** Ethanol stimulates glycogenolysis and inhibits both glycogenesis via gluconeogenesis and from exogenous glucose in perfused rat liver. *Ann Nutr Metab.* 2004; 48(4):276-80.
- Ozbayer C, Kurt H, Ozdemir Z, Tuncel T, Saadat SM, Burukoglu D, Senturk H, Degirmenci I, Gunes HV.** Gastroprotective, cytoprotective and antioxidant effects of *Oleum cinnamomi* on ethanol induced damage. *Cytotechnology.* 2014; 66(3), 431-441.
- Peterson K.** Biomarkers for alcohol use and abuse—a summary. *Alcohol Res Health.* 2004-2005;28(1):30-7.
- Rachdaoui N, Sebastian BM, Nagy LE.** Chronic ethanol feeding impairs endothelin-1-stimulated glucose uptake via decreased G alpha 11 expression in rat adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;285(2):E303-10.
- Saravanan R, Viswanathan P, Pugalendi KV.** Protective effect of ursolic acid on ethanol-mediated experimental liver damage in rats. *Life Sci.* 2006 Jan 11;78(7):713-8.
- Sharpe PC, McBride R, Archbold GPR.** Biochemical markers of alcohol abuse. *QJM.* 1996; 89(2), 137-144.
- Shrivastava RK, Siegal H, Lawlor R, Shah BK, Dayican G.** Doxepin therapy for duodenal ulcer: a controlled trial in patients who failed to respond to cimetidine. *Clin Ther.* 1985; 7(3):319-26.
- Tahir M, Sultana S.** Chrysin modulates ethanol metabolism in Wistar rats: a promising role against organ toxicities. *Alcohol Alcohol.* 2011;46(4):383-92.

## Effect of Cold Stress on Milk Yield, Milk Composition and Some Behavioral Patterns of Simmental Cows Kept in Open Shed Barns

Emrah KAYGUSUZ<sup>1</sup>, Filiz AKDAĞ<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Merzifon Directorate of District Agriculture and Forestry, Amasya, Turkey

<sup>2</sup>Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Breeding and Husbandry, Samsun, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine effect of cold stress on milk yield, milk composition and some behavioural patterns of Simmental dairy cattle kept in open shed barns. In the present study, daily milk yield, milk content, somatic cell count (SCC) in milk and some behavioural patterns of Simmental dairy cattle during winter were determined. Besides, wind chill temperature (WCT) was calculated by using wind speed, temperature and relative humidity rate. In the present study, difference between mean value of wind speed, temperature, relative humidity rate and WCT characteristics were proved as significant ( $P<0.01$ ) depending on months in winter. Difference between mean value determined in months winter as for milk composition traits such as protein and total dry matter rate, and SCC were proved as significant ( $P<0.05$ ). It was also confirmed that negative phenotypic correlation exists between milk fat and total dry matter rate, and WCT ( $P<0.05$ ). There were also significant differences as for rate of incidence of behavioural patterns such as lying and walking during months winter ( $P<0.05$ ). In conclusion, it was determined that cold stress affects protein and total dry matter rate in milk, SCC and behavior patterns such as lying and walking of Simmental dairy cattle.

**Keywords:** Dry Matter, Lying Behavior, Simmental, Wind Chill Temperature.

\*\*\*

### Açık Barınaklarda Yetiştirilen Simmental İneklerinde Soğuk Stresinin Süt Verimi, Süt Bileşimi ve Bazı Davranış Özelliklerine Etkisi

### ÖZ

Bu araştırma, Simmental ineklerde soğuk stresinin süt verimi, süt bileşimi ve bazı davranış özelliklerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Araştırmada, Simmental ineklerin kış mevsimindeki günlük süt verimi, sütün bileşimi, sütteki somatik hücre sayısı (SHS) ve bazı davranış özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, rüzgar hızı, çevre sıcaklığı ve bağıl nem oranı tespit edilerek rüzgar soğutma indeksi (RSİ) hesaplanmıştır. Araştırmada, kış mevsimindeki aylara göre rüzgar hızı, çevre sıcaklığı, bağıl nem oranı ve RSİ özelliklerinin ortalama değerleri arasındaki fark önemli ( $P<0,01$ ) olarak belirlenmiştir. Süt bileşimi özelliklerinden protein ve toplam kuru madde oranları ile SHS'nin kış aylarında belirlenen ortalama değerleri arasındaki farkın önemli ( $P<0,05$ ) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, süt yağ ve toplam kuru madde oranının RSİ ile arasında negatif fenotipik korrelasyon olduğu saptanmıştır ( $P<0,05$ ). Davranış özelliklerinden yatma ve yürüme davranışlarının kış aylarındaki oranlarının önemli düzeyde farklılık gösterdiği belirlenmiştir ( $P<0,05$ ). Sonuç olarak, açık barınakta yetiştirilen Simmental ineklerde soğuk stresinin sütteki protein ve toplam kuru madde oranı ile SHS değerlerini ve yatma ve yürüme davranışlarını etkilediği belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kuru Madde, Rüzgar Soğutma Isısı, Simmental, Yatma Davranışı.

To cite this article: Kaygusuz E, Akdağ F. Effect of Cold Stress on Milk Yield, Milk Composition and Some Behavioral Patterns of Simmental Cows Kept in Open Shed Barns. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3):351-358

Submission: 14.06.2021 Accepted: 31.08.2021 Published Online: 02.09.2021

ORCID ID; EK: : 0000-0001-6984-8526, FA: 0000-0001-9142-9731

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

## INTRODUCTION

Main environmental problem encountered by dairy cattle kept in free stall barns, semi-open barns and on pastures under low temperatures is cold stress. Relative humidity rate, wind speed and solar radiation affect felt temperature and may develop cold stress (Laven and Holmes 2008, Angrecka and Herbut 2015). Under critical temperatures, depending on breed, age, gender, hair mantle, skin structure, size, and body surface (Könyves et al. 2017) in short terms cattle try to cope with cold by showing behavioural and physiological alterations (Mutaf and Sönmez 1984, Demirören 2007). If exposure period gets longer and animals are unable to cope with preserving body heat, they tend to end struggle and it is inevitable for them to die as a result of hypothermia (Young 1983, Demirören 2007).

Cold stress causes increase of basal metabolism speed and increase in additional energy need. As a result, rumination, gastrointestinal system activity, feed and liquid transmission rate increases and digestion ends in shorter periods. That quick digestion results in decrease of energy level acquired out of feed intake (Bickert and Mattiello 2016). Because animals get use of energy derived from feed intake only at survival rate, yield decrease and behavioural changes occur (Broucek et al. 1991, Navratil et al. 2017).

Many studies were conducted in order to state effect of heat stress level on dairy cattle farming (Dikmen and Hansen 2009, Teke and Akdağ 2012, Arı 2015, Benavides et al. 2018, Koç and Uğurlu 2019) and as a result; various indexes were developed making use of several variance such as dry bulb thermometer, wet bulb temperature, dew point, humidity rate, solar radiation and wind speed (Dikmen and Hansen, 2009, Koç and Uğurlu, 2019). However, the number of studies proving effect of cold stress on animals is rare compared to studies on heat stress thus it has been limited to index which determine effect of cold index. Wind chill index (wind chill temperature, WCT), cold stress index and cattle comfort index are used towards determination of cold stress level. Wind chill index was used on human towards specifying risk of freezing and effect of freezing on skin (Siple and Passel, 1945). Because the mentioned index is regarded insufficient for animals due to hair and wool factors, it has been adopted for animals as a result of many researches (Insley 1973, Broucek et al. 1991, Davis et al. 2003, Tucker et al. 2004, Van Laer et al. 2014).

The aim of this study was to determine effect of cold stress caused by climatic factors during winter season in Simmental cows on milk yield, milk composition and some behavioral patterns.

## MATERIAL and METHODS

The study was conducted on Simmental cow kept in a private dairy cattle enterprise in Amasya, Turkey. Totally 24 cows included in the scope of the study were randomly selected among Simmental cows equally on their early lactation period and first three lactation number. No changes were made in the husbandry-feeding conditions of the chosen cows and the regimes of the farm were applied. Diets were consisting of ration of 19% crude protein and 2700 kcal/ME 10 kg dairy cattle feed per animal 24 kg corn silage, 3 kg trefoil and 4 kg hay, and water intake was designed ad libitum. The study was conducted in a free stall barn dairy cattle enterprise where shelters were designed as open shed. The enterprise was formed as open shed for young animals and dairy cows where animals rest, lie down where feeding racks and waterers were situated, and a range area for animals to stroll. Inside of the open shed area was divided by shapes, and automatic non-freezing waterers usable from both sides were placed between the sections. Feeders were installed under the roofed part along the open shed area. The range area of animals including feeders was connected to the open shed area and was surrender by shape fence.

In order to determine daily milk yield and milk composition, morning milking amounts were recorded periodically montly during winter. Milking operation was conducted by a nonfixed milking machine and individually each cow's milk yield was recorded by the milker. After milking of each cow, homogen sample of 40 ml was directed to sterile sample vessel. Samples were put into sterile sample vessels in chemical tablets that prevent microbial growth without affecting milk composition and somatic cell count. The milk samples were transported to the laboratory under controlled cold-chain conditions (+4<sup>0</sup> C). Before analysis, milk samples were heated up to 40<sup>0</sup> C in water bath on the purpose of determining milk fat, protein, lactose and dry matter rate, and freezing point and somatic cell count of milk. Milk analysis were realised via Combi 150 analysis machine, using Flow cytometry analysis, and which is formed with integration of somatic cell counting machine and milk composition measurement machine (Akdağ et al. 2017).

Behaviours of cows were recorded every 15 days by a digital camera as to determine lying, feeding, standing and walking behaviours during winter. Two different 24-hour recording night vision cameras were placed viewing cows under examination and animal behaviours were recorded for 30 minutes on three different periods; after sunrise, at noon and before sunset (approximately at the same hours). During winter totally for 12 hours, 1.5 hours for each day recordings were obtained. After watching the records behavioural rates lying, feeding, standing and walking

were calculated follows (Gastelen et al. 2011, Graunke et al. 2011).

Daily mean dry bulb thermometer, relative humidity rate and wind speed values which belong to enterprise area for 2019 December, 2020 January and February were obtained from district meteorological directorate. In order to calculate daily mean value of wind chilling index referred for measurement of cold stress  $WCT = 13.12 + 0.6215 T_{air} - 13.17 V^{0.16} + 0.3965 T_{air} V^{0.16}$  equivalent, reported by Angrecka and Herbut, (2015) was referred. In this equivalent; WCT stands for wind chilling temperature ( $^{\circ}C$ ),  $T_{air}$  stands for air temperature ( $^{\circ}C$ ) and V stands for wind speed (km/h).

### Statistical Analysis

Non-normally distributed SCC data was logarithmically transformed to  $\log_{10}SCC$ . While comparing daily mean environmental temperature, relative humidity rate, wind speed, WCT, and milk yield and composition on monthly basis, one-way analysis of variance was used. Duncan test was referred in order to determine importance control of difference between the groups. In order to determine correlation between climatic characteristics and milk yield and milk composition, correlation test was applied and as to determine phenotypic correlation factor, Pearson correlation test was referred. So as to compare behavioural rates such as lying, standing, walking and feeding, chi square test was used. All calculations and analyses were performed with the SPSS package (version 21).

## RESULTS

The results of the mean values of some climatic traits measured in winter and standard errors are shown in Table 1. Difference determined in December, January and February between mean value of wind speed, environmental temperature, relative humidity rate and WCT index traits was proved as significant ( $P < 0.01$ ). Mean values of wind speed were determined as 1.13, 0.77 and 1.47 in terms of m/s, and general mean value was determined as 1.12 m/s during December, January and February.

Mean values and standard errors of daily milk yield milk composition and SCC of Simmental cows kept in open shed barns are presented in Table 2. Difference between mean values determined in December, January and February as for milk composition traits such as protein and total dry matter rate, and SCC was proved as significant ( $P < 0.05$ ).

Phenotypic correlation coefficient between climatic traits and milk yield, milk composition and SCC are presented in Table 3. It was determined that while positive correlation exists between milk fat and total dry matter rates and wind speed ( $P < 0.05$ ), there exists negative phenotypic correlation with WCT index ( $P < 0.05$ ).

Percentage of some behavioural patterns of Simmental cows kept in open shed barns recorded in winter are presented in Table 4. Difference of behavioural patterns of percentage lying, feeding, standing and walking in December, January and February was determined to be significant ( $P < 0.01$ ). In addition, when the behaviors by months were compared, the difference between the rates of lying and walking behaviors was found to be statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Table 1.** Mean values and standard errors of some climatic traits in the winter ( $\bar{x} \pm S\bar{x}$ )

Traits	Months			P-value	Overall
	December	January	February		Average
Wind speed (km/h)	4.09±0.36 <sup>b</sup>	2.78±0.33 <sup>c</sup>	5.32±0.35 <sup>a</sup>	0.001	4.07±0.20
Temperature ( $^{\circ}C$ )	4.67±0.49 <sup>a</sup>	1.75±0.38 <sup>b</sup>	3.12±0.82 <sup>ab</sup>	0.003	3.18±0.33
Relative humidity (%)	73.39±1.85 <sup>a</sup>	73.77±1.42 <sup>a</sup>	67.57±2.52 <sup>b</sup>	0.049	71.58±1.13
WCT ( $^{\circ}C$ )	-8.14±1.96 <sup>b</sup>	-6.98±1.31 <sup>b</sup>	-4.94±1.63 <sup>a</sup>	0.002	-10.02±0.96

<sup>a,b,c</sup> Different letters in the same row and for the same trait indicate a statistically significant difference ( $P < 0.01$ ).

**Table 2.** Mean values and standard errors of daily milk yield, milk composition and somatic cell count of Simmental cows in the winter ( $\bar{x} \pm Sx$ )

Traits	Months			Overall
	December	January	February	Average
Daily milk yield (kg)	9.41±0.55	9.23±0.49	9.38±0.46	9.34±0.28
Fat (%)	3.62±0.13	3.57±0.15	3.70±0.06	3.63±0.07
Protein (%)	3.54±0.07 <sup>a</sup>	2.94±0.07 <sup>c</sup>	3.22±0.02 <sup>b</sup>	3.23±0.04
Lactose (%)	4.97±0.05	5.06±0.04	4.92±0.04	4.98±0.02
Total dry matter (%)	13.33±0.17 <sup>a</sup>	12.45±0.17 <sup>b</sup>	13.03±0.08 <sup>a</sup>	12.94±0.09
Freezing point (°C)	0.55±0.001	0.55±0.001	0.55±0.001	0.55±0.001
SCC <sup>1</sup>	4.37±0.13 <sup>c</sup>	5.32±0.05 <sup>b</sup>	5.62±0.08 <sup>a</sup>	5.12±0.08
SCC <sup>2</sup>	74590	245913	562416	301376

<sup>a,b,c</sup> Different letters in the same row and for the same trait indicate a statistically significant difference (P<0.05), SCC<sup>1</sup>: log<sub>10</sub> somatic cell count; SCC<sup>2</sup>: somatic cell count (pcs/ml)

**Table 3.** Phenotypic correlation coefficients among milk yield, milk composition and climatic traits.

Traits	Wind speed	Temperature	Relatif humidity	WCT
Daily milk yield	0.005	0.042	-0.138	0.042
Fat	0.243*	-0.050	0.141	-0.271*
Protein	0.221	0.137	-0.176	-0.132
Lactose	-0.200	-0.212	0.009	0.067
Total dry mater	0.260*	-0.020	-0.087	-0.251*
Freezing point	-0.092	-0.298*	0.025	-0.059
SCC	-0.131	-0.224	0.174	0.027

SCC: log<sub>10</sub> somatic cell count, WCT: Wind chill temperature; \*: P<0.05

**Table 4.** Percentages of some behavioural patterns of Simmental cows in the winter (%)

Traits	Months			P-value
	December	January	February	
Lying	30.61 <sup>a,A</sup>	15.67 <sup>b,B</sup>	15.32 <sup>c,B</sup>	0.046
Feeding	39.82 <sup>a</sup>	43.08 <sup>a</sup>	45.26 <sup>a</sup>	0.850
Standing	23.45 <sup>a</sup>	23.71 <sup>b</sup>	29.93 <sup>b</sup>	0.497
Walking	6.12 <sup>b,B</sup>	17.54 <sup>b,A</sup>	9.49 <sup>c,B</sup>	0.037
P-value	0.001	0.001	0.001	

<sup>A,B</sup>The means with different superscript in each row are significantly different (P<0.05)

<sup>a,b,c</sup>The means with different superscript in each column are significantly different (P<0.01).

## DISCUSSION

Daily mean wind speed for winter was specified as 4.07 km/h (1.12 m/s), environmental temperature as 3.18<sup>0</sup> C and relative humidity rate was specified as 71.58. Besides, difference of mean values of wind speed, heat and relative humidity rate depending on months were proved as remarkable. During the periods when environmental temperature is low, wind speed being below 0.2-0.3 m/s is important in respect to health and yield of cattle especially kept in open barns (Mutaf and Sönmez, 1984). As to this study it was specified that mean daily wind speed determined for each month exceeded the recommended value suitable for cattle kept in open shed barns. It was stated by several studies (Akçapınar and Özbeyaz 1999, Angrecka and Herbut 2015, Navratil et al. 2017, Koç and Uğurlu 2019) that for dairy farming enterprises thermal comfort necessary for animals in order to sustain living activities without decrease in yield should be between -5<sup>0</sup> C and 25<sup>0</sup> C. In the present study, monthly average environmental temperature for cattle reported is in line with the thermal comfort stated above. Moreover, daily average relative humidity rate reported was in line with the optimal humidity rates of 60-75% for animals stated by Uzal (2008) and, Bickert and Mattiello (2016).

In the present study mean WCT values in winter were stated between -6.98<sup>0</sup> C and -14.94<sup>0</sup> C, and it was established that WCT in February reached its peak value (coldest environmental temperature) compared to other months. Even though environmental

temperature in February was recorded as 3.12<sup>0</sup> C, felt temperature by animals was stated as -14.94<sup>0</sup> C. In accordance with these results, considering only environmental temperature, cattles were exposed to comfort thermal but according to WCT values, felt temperature values were under comfort thermal values. Besides, it can be derived that environmental temperature in February felt by animals due to wind and humid was at critical threshold (NRC 1981). In a study on different cattle breeds in Sweden it was reported that whereas environmental temperature measured in December, January and February were 1.4<sup>0</sup> C and -3.3<sup>0</sup> C, values felt by animals were reported as -2.7<sup>0</sup> C and -7.6<sup>0</sup> C (Graunke et al. 2011). In a study conducted on Holstein cows in New Zeland, Tucker et al. (2004), reported environmental temperature inside shelter as -1.2<sup>0</sup> C, but it was reported as -1.9<sup>0</sup> C outside the shelter, and WCT values of these measurements were reported respectively as -1.3<sup>0</sup> C and -9.9<sup>0</sup> C.

In the present study, values of daily milk yield, milk fat, freezing point and lactose rate of milk obtained from Simmental cows measured during winter months were similar, however milk protein and total dry matter values recorded were lower in January, in which environmental temperature was recorded lowest, than other months. Alpan and Aksoy (2015) stated that milk protein rate could change depending on winter period and low levels of energy in ration. Bryant et al. (2007), Laven and Holmes (2008), Bickert and Mattiello (2016) reported that milk yield and composition could vary depending on decrease in environmental temperature, and notably protein and

milk dry matter could decrease as well. Unlike this study, in some other studies it was reported that milk fat and protein rates increased during winter and autumn period when environmental temperature was low (Jenkins and Mc Guire 2006, Özek 2015).

When the phenotypic correlation coefficients between climatic traits, which is one of the results of this study, and milk yield, milk composition and SCC were analysed, it was stated that while correlation between milk fat and total dry matter rate, and wind speed was positive; correlation between these parameters and WCT index was negative. It can be deduced from these results that decrease in milk fat and total dry matter rate may depend on increase in WCT index, and decrease in wind speed. These two climatic traits have perverse effect on milk fat rate and total dry matter rate. Wind chilling index proves total effect of environmental temperature, humidity rate and wind speed, and this index expresses environmental temperature felt by animals. Negative increase of this index is an indicator for decrease in environmental temperature felt by animals. For this reason, taking WCT index into consideration in terms of change in milk fat and total dry matter rate is regarded more beneficial. In some studies, it was expressed that low environmental temperature may cause acceleration of basal metabolism and completion of digestion in shorter time thus as a result of decrease in energy intake obtained via forage, decrease in milk protein rate and milk fat rate could occur, accordingly same decrease in total dry matter could be recorded (Akçapınar and Özbeyaz 1999, Bryant et al. 2007, Laven and Holmes 2008, Bickert and Mattiello 2016).

In the present study, general mean of SCC of Simmental cattle was recorded as 301376 piece/ml in winter and it was determined that SCC increased from December to February. Özkan (2017) determined SCC as 253.000 piece/ml in winter and from summer toward winter increasing numbers of somatic cell were recorded. Dinçel and Dikmen (2013) stated that seasonal change in weather temperature causes variation in milk somatic cell count. Barkema et al. (1999) stated that there could be many factors along with seasonal changes such as lack of implementation of biosecurity rules, lactation period, milking hygiene, inefficiency in milking methods, layout plan of barn, floor of barn, inefficiency and instability of nutrition were influential on change in somatic cell count.

Animal behaviour is an important factor to establish animal yield and welfare level. In the present study, Simmental cow were observed in terms of feeding, lying, standing and walking behaviours and it is specified that in December among behavioural patterns mostly observed ones were feeding (39.82%) and lying (30.61%). As for January and February unlike December, mostly observed behaviour following feeding was standing. In discordance with this study, Koçyiğit (2014) reported that first two

behaviours of intensive dairy cattle were lying (45%) and feed intake (26%). Mostly recorded behaviour that was affected from low environmental temperature was feed intake. Indeed, Çavuşoğlu (2016) reported that factors such as low environmental temperature, high humidity and wind speed increases need for energy and also stated that animals feed intake increases as a result of need for more heat generation. Graunke et al. (2011) also reported that wind and low environmental temperatures make difference on animal behaviours and based on feed intake behaviour, rumination frequency increases during the periods WCT index are recorded low.

When animal behaviours were compared in respect to months, it was determined that difference between rates of lying and walking behaviours was significant and lying behaviour in December was recorded more frequently compared to other months. Walking behaviour was recorded more frequent in January compared to other months. In the present study it is estimated that percentages of lying behaviour to have been reported in December and walking behaviour to have been reported in January was related with climatic factors such as rain and snow. While records were analysed in the study, it was specified that rainfall in December was quite less compared to other months; on the other hand snow fall was recorded in January. Luymes (1994) stated that because of wet floor due to low environmental temperature and rain, rate of animal lying behaviour decreased. Uzal (2008) reported that rate of resting-lying behaviour of animal decreased during extreme cold weather in winter depending on increase in physical activities and feed intake, on the other hand rate of standing increased. In the same study, it was also reported that wet barn floor affected lying duration, standing and feed intake behaviours of animals and they preferred to stand other than lying in order to balance their body heat. Kelly (2003) specified that due to frozen floor as a result of low environmental temperature animals had difficulty in walking thus, they acted other behavioural patterns more frequently than feed intake.

## CONCLUSION

In conclusion, this study proved that WCT index calculated by means of wind speed and environmental temperature was higher in February compared to other months, which means environmental temperature felt by animals was the lowest in February. Besides, it was determined that cold stress is effective on milk protein rate, total dry matter rate, somatic cell count, lying and walking behaviour of Simmental cow kept in open shed barns. In line with the results of the present study, it was concluded that taking rain fall into consideration would result in more precise conclusions about effects of cold stress on different yield characteristics such as milk yield,

fertility and growth, and more researches should be conducted on various species and breeds in order to specify limits of cold stress.

**Acknowledgements:** The authors also thank Prof. Dr. Ömür KOÇAK for assistance in milk analysis.

**Financial Support:** This study was supported by the Scientific Project Office of Ondokuz Mayıs University, Samsun Turkey (PYO.VET.1904.20.001). This research article was summarized from the first author's master's thesis

**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 the Animal Experiments Ethics Committees". In addition, the authors have declared that Research and Publication Ethics are observed.

**Conflict of Interest:** The authors declare that there is no actual, potential or perceived conflict of interest for this article.

## REFERENCES

- Akçapınar H, Özbeyaz C.** Hayvan Yetiştiriciliği Temel Bilgileri. Kariyer Matbaacılık, Ankara. 1999.
- Akdağ F, Uğurlu M, Gürler H, Teke B, Koçak O.** The relationships between udder traits and milk yield, milk composition, and subclinical mastitis in Jersey cows. *Large Animal Review*, 2017; 23(6): 203-209.
- Alpan O, Aksoy AR.** Sığır Yetiştiriciliği ve Besiciliği, 7. Baskı, FAVORİ Basım Yayın ve Matbaacılık, İstanbul. 2015.
- Angrecka S, Herbut P.** Conditions for cold stress development in dairy cattle kept in free stall barn during severe frosts. *Czech J Anim Sci*. 2015; 60(2): 81–87 .
- Arı UÇ.** Sığırlarda ısı stresinin fizyolojik ve hormonal olarak üremeye etkisi. *J Reprod Artif Insemin-Special Topics*, 2015;1(1):1-10.
- Barkema HW, Van der Ploeg JD, Schukken YH, Lam TJGM, Benedictus G, Brand A.** Management style and its association with bulk milk somatic cell count and incidence rate of clinical mastitis. *J Dairy Sci*. 1999; 82:1655-1663.
- Benavides RAM, Guerrero HS, Atzori AS.** A conceptual model to describe heat stress in dairy cows from actual to questionable loops. *Acta Agron*. 2018; 67(1): 59-64.
- Bickert WG, Mattiello S.** Stress in Dairy Animals: Cold Stress: Management Considerations. In: Smithers G, editör in chef. Reference module in food sciences. 1. Edition, Amsterdam, Elsevier. 2016; 1-7.
- Broucek J, Letkovicova M, Kovalcuj K.** Estimation of cold stress effect on dairy cows. *Int J Biometeorol*. 1991; 35:29-32.
- Bryant JR, Lopez Villalobos N, Pryce JE, Holmes CW, Johnson DL.** Quantifying the effect of thermal environment on production traits in three breeds of dairy cattle in New Zealand. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 2007; 50:327-338.
- Çavuşoğlu YS.** Ruminant hayvanlarda beslenme davranışları. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 2016.
- Davis MS, Mader TL, Holt SM, Parkhurst AM.** Strategies to reduce feedlot cattle heat stress: Effects on tympanic temperature. *Journal of Animal Sci*. 2003;81: 649-661.
- Demirören E.** Hayvan Davranışları. 2. Baskı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir. 2007; 1-250.
- Dikmen, S, Hansen, PJ.** Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment. *J Dairy Sci*. 2009; 92:109-116.
- Diñçel D, Dikmen S.** Süt sığırlarında sıcak stresinin tespiti, verim özellikleri üzerine etkileri ve korunma yöntemleri. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*. 2013; 32(1):19-29.
- Gastelen S, Westerlaan B, Houwers DJ, Eerdenburg FJCM:** A study on cow comfort and risk for lameness and mastitis in relation to different types of bedding materials. *J Dairy Sci*. 2011; 94:4878–4888.
- Graunke KL, Schuster T, Lidfors LM.** Influence of weather on the behaviour of outdoor-wintered beef cattle in Scandinavia. *Livestock Science*, 2011; 136:247-255.
- Insley LW.** Wind chill effect. Master Thesis, Kansas State University Manhattan, USA, 1973.
- Jenkins TC, Mc Guire MA.** Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, 2006; 89: 1302-1310.
- Kelly JM.** Managing the feedlot in the cold. Çeviri: Ay S, Çınar H. 2003. [https://www.trouwnutrition.com.tr/contentassets/5ad87435a1d3411bb0d24d2c5a878b9/ruminant-katk-servisler/katki\\_bulten2003-04.pdf](https://www.trouwnutrition.com.tr/contentassets/5ad87435a1d3411bb0d24d2c5a878b9/ruminant-katk-servisler/katki_bulten2003-04.pdf). Accession date: 10.06.2021.
- Koç HU, Uğurlu M.** Süt sığırlarında ısı stresinin verim özellikleri üzerine etkisi, *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*. 2019; 59(1): 30-35.
- Koçyiğit R.** Farklı zemin tiplerinin esmer sığırlarda süt verimi ve süt kompozisyonu ile bazı davranış özellikleri üzerine etkileri. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, 2014.
- Könyves T, Zlatkovic N, Memisi N, Lukac D, Puvaca N, Stojšin M, Halasz A, Miscevic B.** Relationship of temperature-humidity index with milk production and feed intake of Holstein-Frisian cows in different year seasons. *Thai J Vet Med*; 47(1):15-23.
- Laven RA, Holmes CW.** A review of the potential impact of increased use of housing on the health and welfare of dairy cattle in New Zealand. *New Zealand Veterinary Journal*, 2008; 56(4):151-157.
- Luymes J.** Free stall design. *British Columbia of Agriculture and Food Ministry, Farm Structures Factsheet*, 1994;1-13.
- Mutaf S, Sönmez R.** Hayvan Barınaklarında İklimsel Çevre Denetimi. 3. Baskı, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, İzmir. 1984.
- Navratil S, Falta D, Chladek G.** Effect of temperature cumulation on milk yield of Czech Fleckvieh-Simmental Cattle. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, 2017; 65(5):1579-1584.
- NRC.** Effect of Environment on Nutrient Requirements of Domestic Animals. National Acad. Press, Washington DC, 1981; 1-21.
- Özek K.** Süt sığırlarında süt kompozisyonunu etkileyen faktörler ve besleme-süt kompozisyonu ilişkisi. *Bahri Dağdaş Hayvancılık Araştırma Dergisi*, 2015; 4(2):37-45.
- Özkan M.** Süt sığırlarında somatik hücre sayısının süt bileşimi ve kalitesine etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ. 2017.
- Siple PA, Passel CF.** Measurements of dry atmospheric cooling in subfreezing temperatures. *American Philosophical Society*, 1945; 89:177-199.
- Teke B, Akdağ F.** The effect of heat stress on some reproductive traits in Jersey cows under semi-humid



conditions in Turkey. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 18(4): 506-510, 2012.

**Tucker CB, Weary DM, Fraser D.** Free-Stall dimensions: effects on preference and stall usage. J Dairy Sci. 2004; 87:1208-1216.

**Uzal S.** Serbest ve serbest duraklı süt sığırı bannaklarında hayvanların alan kullanımı ve zaman bütçesine mevsimlerin etkisi. Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya. 2008; 1-197.

**Van Laer E, Moons CPH, Sonck B, Tuyttens FAM.** Importance of outdoor shelter for cattle in temperate climates. Livestock Science, 2014; 159:87-101.

**Young BA.** Ruminant cold stress: Effect on production. J Anim Sci. 1983; 57:1601-1607.

## Investigation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Bee Pollen Collected from Different Geographical Regions in Turkey

Paria TABATABAEI<sup>1</sup>, Cevat NISBET<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 55135, Samsun, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity, total phenolic acid, and total flavonoid content in bee pollen collected from different regions of Turkey. A total of 81 bee pollen samples from 81 beekeepers were collected from 6 different regions of Turkey. Total phenolic content of pollen samples was determined in mg gallic acid equivalent gr pollen sample (mgGAE/gr) and total flavonoid analysis was made with a spectrophotometric method in mg based on quercetin (QE/g) concentration. Total antioxidant level was conducted according to free radical scavenger effects of pollen on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) as an indirect method. According to the results of the study, total phenolic acid levels of pollen differed between 7.81 and 57.69 (mg GAE/g), total flavonoid content differed between 3.72 and 4.97 (mg QE/g) and DPPH differed between 55.18 and 94.08 (mg/ml). It is considered that the study data will contribute to the presentation of the chemical components of Turkish bee pollen.

**Keywords:** Antioxidant, apitherapy, bee pollen, flavonoid, phenolic.

\*\*\*

### Türkiye'nin Farklı Coğrafi Bölgelerinden Toplanan Arı Poleninin Fenolik Bileşikleri ve Antioksidan Kapasitelerinin Araştırılması

### ÖZ

Bu çalışmada, Türkiye'nin değişik bölgelerinden toplanan bal arısı polenlerin toplam fenolik asit, flavonoid düzeyleri ve total antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Polen numuneleri Türkiye'nin farklı bölgelerden 81 arıcıdan toplam 81 örnekten temin edilmiştir. Toplam fenolik madde içeriği kuru ağırlığın gramı başına mg gallic asit eşdeğeri (mgGAE/gr) ve toplam flavonoid analizi ise gramı başına quercetin (mgQE/gr) konsantrasyon temel alınarak spektrofotometrik bir yöntem ile yapılmıştır. Total antioksidan düzeyi indirekt metot olarak polenin DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkilerine göre yapılmıştır.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre polenin total fenolik asit düzeyleri 7.81 ile 57.69 (mgGAE/g), toplam flavonoid düzeyleri 3.72 ile 4.97 (mgQE/g) ve DPPH ise 55.18 ile 94.08 (mg/ml) aralığında değişkenlik göstermiştir. Çalışma verilerinin Türk arı poleninin kimyasal yapısının ortaya konulmasında katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidan, apiterapi, arı poleni, flavanoid, fenolik

To cite this article: Tabatabaei P, Nisbet C. Investigation of Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Bee Pollen Collected from Different Geographical Regions in Turkey. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3): 359-365

Submission: 25.12.2020 Accepted: 25.08.2021 Published Online: 03.09.2021

ORCID ID; PT: 0000-0001-6038-0445, CN: 0000-0002-7042-4605

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

## INTRODUCTION

For centuries, human beings have used bee products for therapeutic purposes in addition to their use as food products. Bee pollen forms in the antenna of flowering plants with the combination of pollen which is the male reproductive organ with a role in pollination and bee secretion and it is one of the primary nutritional sources used for colony development (Almeid-Munadion et al. 2005). Depending on different plant sources, the pollen obtained has been reported to consist of approximately 200 compounds. Pollen, which includes an average of 1,6% phenolic compounds, also has a high variation of flavonoids, leukotrienes, catechins, phenolic acid, flavonol and flavonol glycosides (Asfova et al. 2001; Saraiva et al. 2018). Studies have shown that phenolic compounds are responsible for bee pollen's anti-microbial (Morais et al. 2011), anti-inflammatory (Maruyama et al. 2010; Lopes et al. 2019), anti-mutagenic (Tohamy et al. 2014; AL-Yuosef et al. 2020), anti-fungal (Marinova and Tcharbanov, 2011), anti-nociceptive and anti-oxidant (Freire et al. 2012; Ghouizi et al. 2020) activities. These activities depend completely on the chemical structure and biochemical characteristics of bee pollen (Mosaic et al.2019). In other words, the concentration and components of phenolic compounds also change the quality of pollen's different biological activity (Freire et al. 2012). Therapeutic activity bee pollen shows are not valid for all pollens in the same level because the chemical content of bee pollen changes depending on the source of plants. In addition to collecting pollens from different types of flowers, bees also transfer different chemical substances within this plant to pollen content (Nagai et al.2002; Nisbet et al. 2009). Thus, the chemical composition of pollen differs depending on the type of plant. Chemical composition and biochemical features of pollen differ based on the types of plants from which pollen is collected, geographical source and season (Morgano et al. 2012). This change also changes the composition of the active substances of especially pollen. This study examines the total phenolic compounds and antioxidant capacity of bee pollens collected from different regions of Turkey.

## MATERIAL and METHOD

Pollen samples to be used in the study, a total of 81 samples from 81 beekeepers were collected from different regions of Turkey as Central and Eastern Black Sea (13), Marmara (13), Central Anatolia (16), Mediterranean (13), Aegean (13), and Eastern-

Southern Anatolia (13) between May and July. In the selection of pollen samples, pollen diversity, different regions and being free from environmental pollution were taken into consideration. The beekeepers from whom the samples were collected were registered to bee re-registration system. The pollens which were brought to the laboratory under healthy conditions were dried in a stove at 40 oC for 48 hours. They were ground and powdered and to prepare the methanol extracts of pollens 1 gram was taken from each sample and solubilized in 25 ml distilled methanol (4% methanol stock pollen solutions).

### Total Phenolic Matter Amount Analysis

Total phenolic concentration level was applied by modifying Folin-Ciocalteu method (Bertoncelj et al., 2007). Total phenolic content of pollen samples was determined in mg gallic acid equivalent gr pollen sample (mgGAE/gr) by using Folin-Ciocalteu reactive.

### Total Flavonoid Matter Amount Analysis

Total flavonoid analysis was determined with the modification of the method developed by Chang et al.,(2002). Absorbances prepared by being based on quercetin (mgQE/g) concentration in mg in 1 gram pollen were read in a spectrophotometer at 415 nm.

### DPPH Radical Scavenger Activity Measurement

Antioxidant activity of pollen samples was measured by a small modification of the method suggested by Meda et al.,(2005) by depending on the ability of catching DPPH radical. Antioxidant activity was calculated as the % inhibition of DPPH radical by making use of the following equation:

$$\% \text{ inhibition} = (\text{Control absorbance} - \text{Sample absorbance}) \times 100.$$

### Statistical Analyses

The data obtained from the study were analyzed with variance analysis (ANOVA) technique and differences between averages were determined with Duncan multiple comparison test. Statistical assessments were made by using SPSS program.

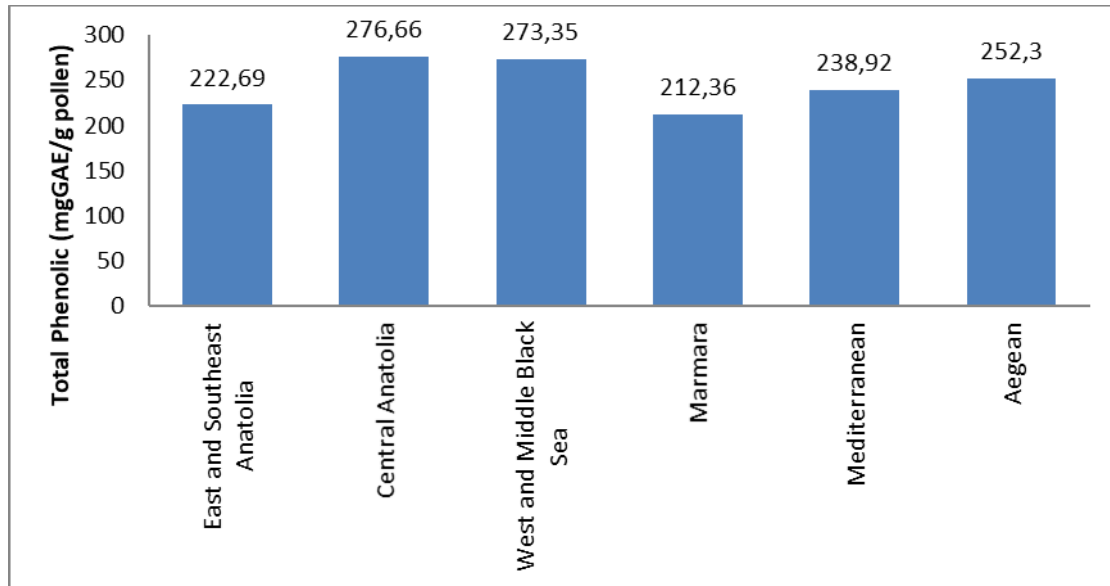
## RESULTS

### Total Phenolic Matter Amount:

Total phenolic content in pollen samples was found to differ between  $21.23 \pm 1.38$  and  $27.66 \pm 2.91$  (mg GAE/g pollen). However, no statistically significant difference was found between regions ( $P < 0.05$ ) (Table 1 and Figure 1).

**Table 1** Bölgeler arası polen ekstraktların toplam fenolik, flavonoid ve antioksidan düzeyleri  
**Table1** Total phenolic, flavonoid and total antioxidant levels of pollen extracts of regions.

Regions	Total phenolic (mg GAE/g pollen)	Min-Max	Total flavonoid (mg QE/g pollen)	Min-Max	Antioxidant, DPPH-sc <sub>50</sub> (mg/ml)	Min-Max
E.Southeast Anatolia	22.26 ± 2.36	8.88 – 34.13	4.19 ± 0.53	2.20 - 7.79	76.14 ± 2.97	55.18 - 91.54
Central Anatolia	27.66 ± 2.91	15.19 – 57.69	4.14 ± 0.45	0.05 - 8.66	74.97 ± 3.22	46.93 - 94.08
Black Sea	27.33 ± 2.32	16.88 – 45.82	3.72 ± 0.25	2.41 - 5.40	77.93 ± 3.63	41.65 - 94.08
Marmara	21.24 ± 1.38	16.01 – 32.52	4.89 ± 0.32	3.26 - 6.57	77.04 ± 3.62	42.28 - 89.43
Mediterranean	23.89 ± 2.69	12.96 – 45.80	4.97 ± 0.64	0.85 - 8.91	77.48 ± 2.14	68.92 - 88.16
Aegean	25.23 ± 3.45	7.81 – 52.98	4.96 ± 0.52	2.78 - 8.16	69.49 ± 5.61	36.15 – 92.18
<b>Total</b>	<b>24.60± 2.52</b>	<b>-</b>	<b>4.48 ± 0.45</b>	<b>-</b>	<b>75.51± 3.53</b>	<b>-</b>

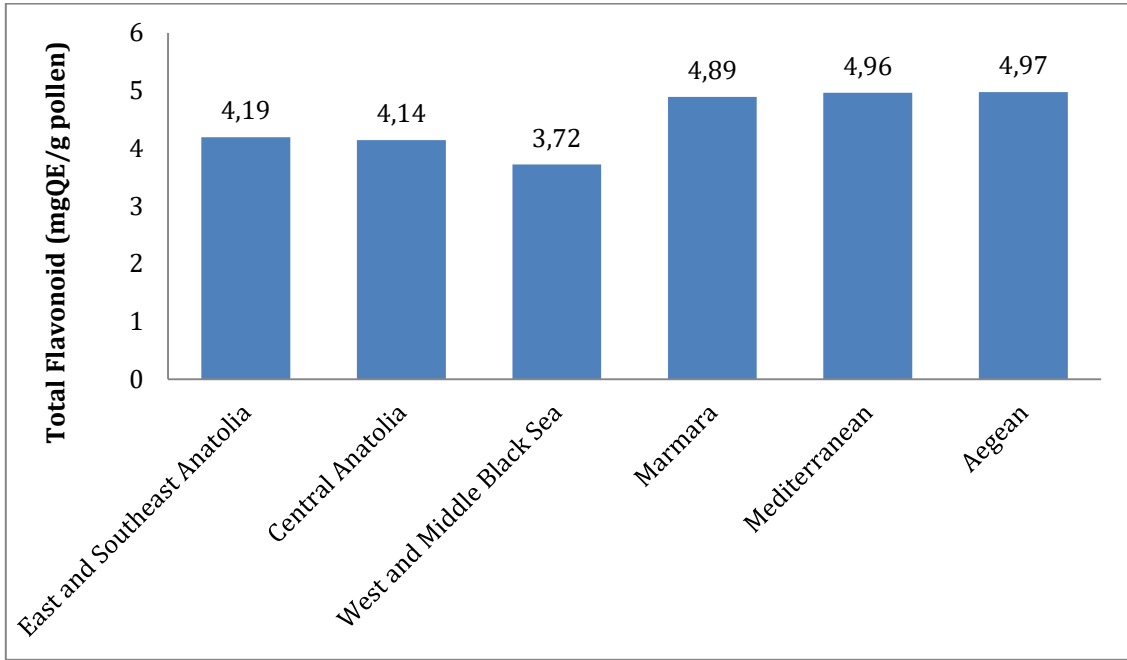


**Şekil 1.** Bölgeler arası polen ekstraktların fenolik madde miktarı  
**Figure 1.** Total phenolic amount in pollen extracts of different regions

**Total Flavonoid Matter Amount:**

Total flavonoid levels found in pollen samples of groups are presented in Table 1 and Figure 2. According to the data obtained, the lowest value between groups was found in the Eastern and

Central Black Sea region ( $3.72 \pm 0.25$  QE/g), while the highest value was found in Aegean and Mediterranean pollen ( $4.97 \pm 0.64$  ve  $4.96 \pm 0.52$ ) ( $P < 0.05$ ).

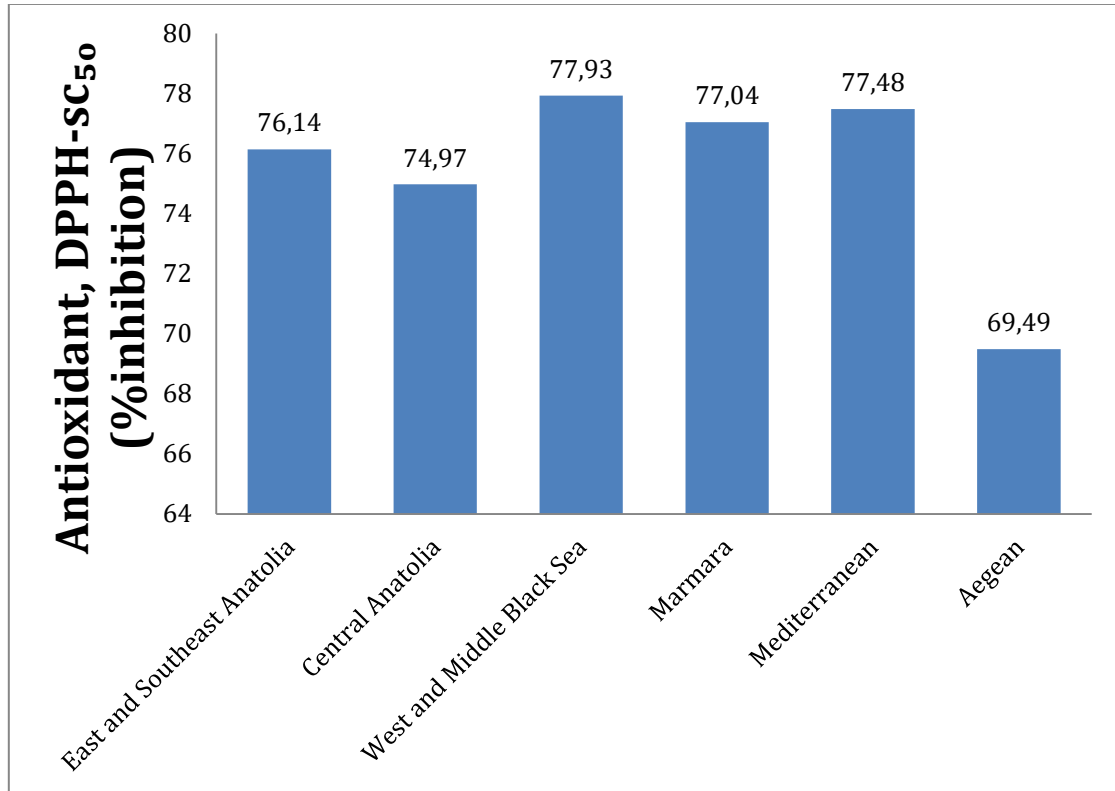


**Şekil 2.** Bölgeler arası polen ekstraktların flavonoid analiz sonuçları  
**Figure 2.** Flavonoid analysis results in pollen extracts of regions

### Total Antioxidant Activity

Average values of the total antioxidant activity are shown in Table 1 and Figure 3. The comparison of

radical scavenging activity in pollen groups showed that pollens of the Aegean region had the highest antioxidant capacity ( $69.49 \pm 5.61$ ) ( $P < 0.05$ ).



**Şekil 3.** Bölgeler arası polen ekstraktların antioksidan analiz sonuçları  
**Figure 3.** Antioxidant analysis results of pollen extracts of regions

## DISCUSSION

In our study, the average pollen the total phenolic content of groups in bee pollen samples collected from different regions of Turkey was found as  $24.60 \pm 2.52$  mg/g. These values were found to differ between minimum 7,81 and maximum 57,69 mg/g. No statistically significant difference was found between the comparison of groups. When the phenolic matter intensity obtained in the study was compared with other countries, total phenolic content of pollens collected from the southeast of Brazil was reported to differ between 41,5 and 213,2 mg/g (Freire et al. 2012). In a study conducted in the North of the United States of America by LeBlanc et al. (2009), pollen phenolic acid levels were reported as 15,91-34,85 mg/g. In a study conducted in Poland Kraków, total phenolic matter from different plants was found to differ between 1293-8243 mg/100g (Leja et al. 2007), while it was reported as  $10,49 \pm 0,3$  mg/gr on average in Greek pollen (Graikou et al. 2011). In a study conducted in Venezuela, polyphenol concentration was reported to be between 396,7 and 1286,7 GAE/100 g (Pérez-Pérez et al. 2012). In pollens obtained from plants in 5 natural parks in Portugal, phenolic compound content was found to differ between 10,5 and 16,8 mg GAE/g (Morais et al. 2011). In another study conducted in Spain, phenolic content of pollens obtained from different regions was reported to differ between 18,55mg/g and 32,15mg/g (Pascoal et al. 2014). The average total phenolic acid in Algeria was calculated as  $30,46 \pm 8,22$  mg GAE/g (Rebiai et al. 2012). In a study conducted in Romania (Marghitas et al. 2009), found total phenolic level was between  $4,4 \pm 0,1$  and  $16,4 \pm 0,3$  mg GAE/g. In another study conducted in Lithuania, this rate was reported as between 24,4-38,9 mg GAE/g (Kaskoniene et al. 2015). Pollen phenolic matter concentration in the present study is found to have a high value when compared with other literature. In the study, total flavonoid content of the regions was found as  $4.48 \pm 0.45$ . According to these data, the lowest value was found in eastern and central Black Sea region ( $3.72 \pm 0.25$  QE/g), while the lowest value was found in Aegean and Mediterranean pollen as ( $4.97 \pm 0.64$ ) and ( $4.96 \pm 0.52$ ). When these data were compared with other countries, Spanish pollen flavonoid concentration was found to differ between 3.92 and 10.14 mg/g (Pascoal et al. 2014), while this value was calculated as  $8.92 \pm 5.5$  mg/g in Algeria (Rebiai et al. 2012). In their study they conducted in Romania (Marghitas et al. 2009), found total flavonoid concentration as  $0.6 \pm 0.03$  and  $13.6 \pm 0.2$  (mg/g). In a study conducted by LeBlanc. et al.(2009) in the North of America, pollen total flavonoid was reported to differ between (2.54- 5.48 mgQE/gr). In a study conducted in Poland, total flavonoid was reported to be between

(171- 1068 mg/ 100gr) (Leja et al. 2007). In their study conducted in Lithuania, (Kaskoniene et al. 2015) reported that this value differed between 7.3 - 10.0 mg/g range. In the study, the comparison of radical scavenger activity between groups showed that Aegean region's pollen had higher antioxidant capacity when compared with other regions ( $69.49 \pm 5.61$ ). When antioxidant capacity of Turkish pollen was compared with other literature, % inhibition in Romanian pollen was reported as between  $0.135 \pm 0.01$  and  $2.81 \pm 0.03$  (Marghitas ve ark. 2009), while it was recorded as between 30.7 and 34.9 in Lithuania honey (Kaskoniene et al. 2015). In another study, it was suggested that seasons were effective on pollen chemical compound and antioxidant level could change between spring (12.8) and fall (90.4) (Freirer et al. 2012). In a study conducted in Poland, total antioxidant activity was found to differ a lot (6.8% – 86.4) (Leja et al. 2007). In the United States of America, DPPH % inhibition values were found to differ between (19.76 -90.45) in methanol extraction (LeBlanc. et al. 2009). In Mexico pollen, these values were found as  $0.39 \pm 0.05$  IC50 ( $\mu\text{g/ml}$ ) (Almaraz-Abarca et al. 2007). In a study conducted in Brazil, this value was found as  $104.5 \pm 0.5$  in yellow pollen and as  $106.1 \pm 1.3$  EC50 ( $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$ ) in brown pollen (SarmantoSilva et al. 2006). In studies conducted in Turkey, (Avşar et al. 2016) reported total phenolic content as between  $.02 \pm 0.26$  mg GAE g<sup>-1</sup> and  $103.8 \pm 6.72$  mg GAE g<sup>-1</sup> and radical scavenger activity as IC50= 0.093-19.5 mg/mL. In another study, phenolic level was reported as between  $24.151 \pm 1.062$  and  $105.206 \pm 2.550$  (mg GAE/100g), while total antioxidant activity was reported as between  $1.144 \pm 0.010$  and  $3.320 \pm 0.028$   $\mu\text{g/mL}$  (Aygul ve ark. 2016). Ulusoy (2010) reported that total antioxidant activity of Anzer pollen samples was between 0.65 and 5.98 mg/ml and total phenolic matter amount was between 44,07 and 124,10 mg/g.

The factors affecting different values between studies are plants source, season, storing and extraction method (Kroyer and Hegedus., 2001; SarmantoSilva et al., 2006; LeBlanc. et al. 2009; Freire et al. 2012).

## CONCLUSION

In this study, total phenolic matter compounds and antioxidant levels of bee pollens from different regions of Turkey were found. The results obtained were compared with the biochemical data of the bee pollens produced in other countries. From the results obtained, it is possible to state that the most important reasons for the difference in bee pollen biochemical values between regions and countries were plant source, soil, season and storing and extraction method.

**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, Ondokuzmayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından (PYO. VET.1904.16.005). proje numarası ile desteklenmiştir.

**Teşekkür:** Bu çalışmada desteklerini veren Prof. Dr. Hatice Bozoğlu hocamıza teşekkürlerimizi sunarız

**Açıklama:** VIII. Ulusal/II. Uluslararası Veteriner Gıda Hijyeni Kongresinde (2019) özet bildiri olarak sunulmuştur.

## REFERENCES

- Almaraz-Abarca N, Campos M, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Corral JH, et al. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee- collected pollen from mesquite. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007; 20: 119–124.
- Al-Yousef HM, Amina M, Alqahtani AS, Alqahtani MS, Malik M, et al. Pollen Bee Aqueous Extract-Based Synthesis of Silver Nanoparticles and Evaluation of Their Anti-Cancer and Anti-Bacterial Activities. *Processes*, 2020; 8 (524): 2-12.
- Asafova N, Orlov B, Kozin R. Physiologically active bee products. Y. A. Nikolaev, Nizhny Novgorod, Russia. edited by: Y. A. Nikolaev. 2001; 360-265.
- Avşar C, Özler H, Berber I, Civek S. Phenolic composition, antimicrobial and antioxidant activity of castaneasativa mill. pollen grains from Black Sea region of Turkey. *International Food Research Journal*. 2016; 23(4): 1711-1716.
- Aygul M, Yaylaci Karahalil F, Supuran CS. Investigation of the inhibitory properties of some phenolic standards and bee products against human carbonicanhydrase I and II. *J. Enzyme Inhib Med Chem*. 2016; 1-6.
- Bertoncelj J, Doberšek U, Jamnik M, Golob T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of slovenian honey. *Food Chemistry*. 2007; 105: 822-828.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002; 10(3): 178-182.
- Feas X, Vazquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic bee pollen botanical origin nutritional value bioactive compounds antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*. 2012; 17: 835-837.
- Freire KR, Lins AC, Dórea MC, Santos FA, Camara CA et.al. Palynological origin phenolic content and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from bahia, Brazil. *Molecules*. 2012; 17:1652-1664.
- Ghouizi AE, Menyiy NE, Falcao S, Vilas-Boas M, Lyoussil B. Chemical composition, antioxidant activity, and diuretic effect of Moroccan fresh bee pollen in rats. *Veterinary World*, 2020; 13(7): 1251-1261.
- Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroidis G, Chondrogianni N et.al. Chemical analysis of greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and protea some activation properties. 2011;5 (33): 2-9.
- Kaškonienė V, Kaškonas P, Maruška A. Volatile compounds composition and antioxidant activity of bee pollen collected in Lithuania. *Chemical Papers*. 2015; 69(2): 291-299.
- Kroyer G, Hegedus N. Evaluation of bio active properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 2001; 2(3): 171-174.
- LeBlanc BW, Davis OK, Boue S, DeLucca A, Deeby T. Antioxidant activity of sonoran desert bee pollen. *Food Chemistry*. 2009; 115:1299-1305.
- Leja M, Mareczek A, Wyzgolik G, Klepacz Baniak J, Czekon´ska K. Antioxidative properties of bee pollen in selected plant species. *Food Chemistry*. 2007; 100: 237–240.
- Lopes AJO, Vasconcelos CC, Pereira FAN, Silva RHM, Queiroz PFDS, et al. Anti-Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee *Melipona fasciculata*. *Int. J. Mol. Sci*, 2019; 20: 2-20.
- Marghitas .A, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobis O, Popescu O et.al. Invitro antioxidant capacity of honey bee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*. 2009;115:878–883.
- Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *cistus* sp. of spanish on carrageenan induced rat hind paw edema. *Complementary and Alternative Medicine*. 2010; 10(30): 2-11.
- Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem*. 2005;91:571-577.
- Morais M, Moreira L, Feas, Estevinho LM. Honey bee collected pollen from five portuguese natural parks: palynological origin phenolic content antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food and Chemical Toxicology*. 2011; 49:1096–1101.
- Mosic M, Trifkovic J, Vovk I, Gasic U, Tesic Z, Sikoparija B, Opsenica DM. Phenolic Composition Influences the Health-Promoting Potential of Bee-Pollen. *Biomolecules* 2019; 9,783: 2-14.

- Nagai T, Inoue R, Inoue H, Suzuki N.** Scavenging capacities of pollen extracts from *Cistus ladaniferus* on autoxidation, superoxide radicals, hydroxyl radicals, and DPPH radicals. *Nutrition Research*. 2002; 22: 519-526.
- Nisbet HÖ, Nisbet C, Yanım M, Güler A, Özak, A.** Effects of different type of honey on healing of cutaneous wounds. *Wounds*. 2009; 21(7): 183-191.
- Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feas X, Leticia M.** Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. 2014; 63:233-239.
- Perez Pérez EM, Vit P, Rivas, E, Sciortino R, Sosa A et al.** Antioxidant activity of four color fractions of bee pollen from Mérida, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr*. 2012; 62(4): 375-80.
- Rebiai A, Lanez T.** Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from north west Algeria. *J.Fundam. Appl Sci*. 2012; 4(2): 155-163.
- Silva TMS, Amorim Camara CA, Silva Linsa AC, Barbosa Filho JM, Silva EM et.al.** Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2006; 19: 507-511.
- Saraiva L, Cunha F, Lélis D, et al.** Composition, biological activity and toxicity of bee pollen: State of the art. *Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas*, 2018; 17(5): 426 - 440.
- Tohamy AA, Abdella EM, Ahmed RR., Ahmed YK.** Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology*. 2014; 66: 283-297.
- Ulusoy E.** Determination of phenolic components of anzer honey and pollen by high performance liquid chromatography and their antioxidant properties. PhD thesis, Karadeniz Teknik university, Science Institute, Trabzon, 2010.



## Comparison of The Efficiency of Ethacridine Lactate and Hypochlorous Acid During the Early Period of Wound Healing in Rats

Yahia ALHBOU<sup>1</sup>, Birkan KARSLI<sup>1</sup>, Tuğçe SÜMER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kirikkale University, Veterinary Faculty, Surgery Department, 71451, Kirikkale, Turkey

<sup>2</sup>Kirikkale University, Veterinary Faculty, Pathology Department, 71451, Kirikkale, Turkey

### ABSTRACT

The aim of this study is to compare the effects of ethacridine lactate and hypochlorous acid on wound healing in rats through clinical and histopathological studies. The rats were divided into three groups; group 1; control group, group 2; hypochlorous acid (HOCL) group, group 3; ethacridine lactate (EL) group. Each group contained seven animals. Under anesthesia, a 20 mm long full layer skin resection was performed from dorsal interscapular region. Wound sizes were measured with millimetric paper on the 3rd, 7th and 14th day postoperatively. At the end of the 14th day, the animals were sacrificed under deep anesthesia and extensive skin resection of the wound area was performed and sent for histopathological examination. Macroscopic examination of wounds revealed that the wound was completely closed without any crust formation in the HOCL group, and also there was only a scar left in some animals of the HOCL group at the end of 14th day. Mild inflammatory cell, intense fibroblast activity and the lowest SOD and GPx immunoreactivity were found in the HOCL group compared to the other two groups (P<0.05). Consequently, it was observed that macroscopically and histopathologically, the wound healing was faster in animals treated with HOCL compared to those who were in the EL and the control group.

**Keywords:** Ethacridine lactate, histopatology, hypochlorous acid, rat, wound healing.

\*\*\*

### Ratlarda Erken Dönem Yara İyileşmesinde Etakridin Laktat ve Hipokloröz Asit Etkinliğinin Karşılaştırılması ÖZ

Bu çalışmanın amacı, etakridin laktat ve hipokloröz asidin ratlarda yara iyileşmesi üzerine etkilerinin klinik ve histopatolojik olarak karşılaştırılmasıdır. Ratlar 3 gruba ayrıldı; grup 1; kontrol grubu, grup 2; hipokloröz asit (HOCL) grubu, grup 3; etakridin laktat (EL) grubu. Her grupta 7 hayvan bulunmaktaydı. Anestezi altında, dorsal interskapular bölge derisinden 20 mm çapında tam katman deri rezeksiyonu yapıldı. Yara genişlikleri postoperatif 3., 7. ve 14. günlerde milimetrik kağıtlarla ölçüldü. Ondördüncü gün sonunda ratlar derin anestezi altında sakrifiye edildi ve yara bölgesi rezeksiyonu yapılarak histopatolojik muayene için gönderildi. Makroskopik yara muayenesinde, 14 gün sonunda HOCL grubundaki yaraların kabuk oluşmadan kapandığı, bazı yaralarda ise sadece bir skar çizgisi olduğu görüldü. Histopatolojik incelemelerde, HOCL grubu yaralarında düşük yangı hücresi, yoğun fibroblast varlığı ve düşük SOD ve GPx immunoreaktivitesi tespit edildi (P<0.05). Sonuç olarak, HOCL ile tedavi edilen hayvanlarda EL ve kontrol grubuna göre makroskopik ve histopatolojik olarak yara iyileşmesinin daha hızlı gerçekleştiği görüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Etakridin laktat, hipokloröz asit, histopatoloji, sıçan, yara iyileşmesi

To cite this article: Albou Y, Karş B, Sümer T. Comparison of The Efficiency of Ethacridine Lactate and Hypochlorous Acid During the Early Period of Wound Healing in Rats. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3): 366-375

Submission: 04.01.2021 Accepted: 29.07.2021 Published Online: 06.09.2021

ORCID ID; YA: 0000-0003-3891-3860, BK: 0000-0003-4208-3134, TS: 0000-0001-7033-0759

\*Corresponding author e-mail: birkankarsli@gmail.com

## INTRODUCTION

Wound treatment methods have been researched for many years based on the healing and repair of the tissue (Ferguson 1988). Many healing agents are applied locally for wound treatment. Antiseptics are topical agents which are applied to living tissues and they play an important role in cleaning and/or treating open wounds and also they have ability to inhibit the proliferation of microorganisms without damage in living tissue and skin (Visser and Winterbourn 1995). Antiseptics contain a wide range of active chemicals. While some of these substances have bacteriocidal effects, some others have bacteriostatic effects. Today, a wide range of antiseptic substances are used in wound treatment. Ethacridine lactate (EL), (Rivanol%1) is one of the most preferred antiseptics in wound healing for many years. In recent years, hypochlorous acid (HOCL), 0.02% has been widely used for wound treatment in humans and animals (Chai and Kim 1998).

HOCL is one of the products that arises as a result of the oxidative process produce of the neutrophils and macrophages in the immune system. HOCL is effective in wound healing and wound protection. (Marcinkiewicz et al. 2000). The neutral pH of HOCL solution gives it the properties of a safe sterilizer and an effective biocide compound. HOCL is considered as a nonirritant agent and they reduce the production of adeno triphosphate (ATP) in the bacterial cell. HOCL destroys the bacterial cell by inhibiting protein synthesis and preventing cell division and proliferation (McKenna and Davies 1988). HOCL has a wide spectrum of effects and has proven itself to be an effective agent even in the presence of biofilms on the wound (Shigeta et al. 1997). HOCL has shown to be an effective agent because of its antimicrobial, antipruritic and anti-inflammatory properties. It increases the oxygenation in wound areas (infected area) and it is also shown as an effective agent that breaks down the biofilm on the infected wound (Bongiovanni 2006). In vitro studies on antibacterial and antiviral effects of HOCL, it has been demonstrated that HOCL solution eliminates *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* and *Candida albicans* in pure culture (Zeng et al. 2010). HOCL is highly active against all bacterial, viral and fungal pathogens and a small amount of HOCL can kill spore-forming and non-spore-forming bacteria in a short time (Aratani 2006).

EL is one of the topical antiseptic agents widely used for treatment of infected wound for many years. At first it was used as an antiseptic solution, with a concentration of 1%. It has been reported that EL stimulates the release of anti-inflammatory cytokines (interleukin-10) during angiogenesis and formation of granulation tissue in

vitro (Reinhardt et al. 2005). EL is an antibacterial and neutral medical substance that has a lethal effect on many types of bacteria. It has bactericidal effect, especially on gram-positive bacteria such as *Streptococcus* and *Staphylococcus*, while it is ineffective on gram-negative bacteria such as *Pseudomonas*. EL disrupts DNA synthesis by entering between the base pairs in the deoxyribonucleic acid (DNA) of bacteria. The antibacterial effects are owed to the disruption of DNA synthesis (Wainwright 2001).

The purpose of this study was to compare between ethacridine lactate and hypochlorous acid on wound healing in rat wound model through clinical and histopathological studies

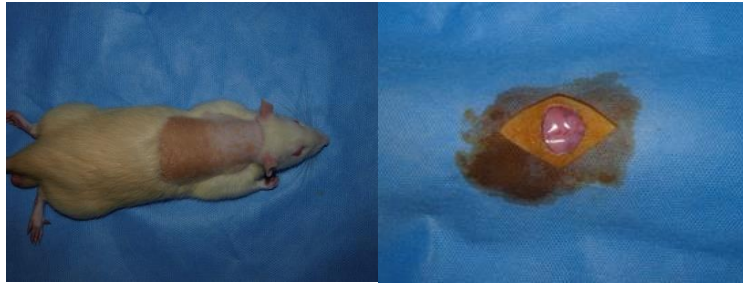
## MATERIAL and METHOD

The study was approved by Kirikkale University Animal Experiments Local Ethics Committee (2019/47).

### Animals

In this study, 21 healthy, male, adult albino Wistar rats were used. The feed and water were given as ad libitum. Animals were divided into three groups; group 1: Control group, group 2: HOCL group, group 3: EL group. Each group contained seven animals.

Anesthesia was performed by intramuscular administration of Xylazine (15 mg/kg) (Rompun, Bayer, Germany) and ketamine (100 mg/kg) (Ketalar, Pfizer, Turkey). Dorsal interscapular region was shaved and prepared for operation (Figure 1A). The animals were placed in sternal recumbency and a full layer (dermis+epidermis) skin resection was performed with a 20 mm diameter punch biopsy instrument (Figure 1B). Three ml saline solution (0.9 %) isotonic sodium chloride, Polifarma, Turkey) was administered to all animals via subcutan route. Flunixin meglumine were administered subcutaneously at a dose of 2.5 mg/kg for postoperative analgesia. HOCL (Crystalin spray 0.02%, NHP, Turkey) was applied to the HOCL group and EL (Rivanol spray 0.1 %, Oro, Turkey) was applied to the EL group once a day for a period of 14 days. No medicine was used in the control group, but the animals in this group were lifted by their tails in order for them to experience the same level of anxiety as the animals of the other groups. Animals were anesthetized on the 3rd, 7th and 14th days for the purpose of measuring the wound size on the millimetric paper (Figure 2). At the end of the 14th day, the animals were sacrificed under deep anesthesia and extensive skin resection including the wound area was performed and sent for histopathological examination.



**Figure 1. (A)**Preoperative preparation. **(B)** Creation of wounds



**Figure 2.** Drawing the wound sizes schematically for measuring with millimetric paper.

### Histopathologic analysis

Tissue samples were fixed in 10% buffered formalin and processed routinely, embedded in paraffin wax, sectioned (4-5  $\mu\text{m}$ ) and stained with haematoxylin and eosin (HE) and Masson's trichrome (Bio Optica, Italy). The slides were examined by light microscopy (Olympus BX51, Tokyo, Japan) and digital photomicrographs were taken. Serial tissue sections were used for single and/or double-labeling immunohistochemistry. Histopathologically, the severity of inflammation, reepithelization, neovascularization and presence of fibroblast and collagen were evaluated and scored as follows (Abramov et al. 2007): Inflammatory cells 0: none, 1: 1-5 cells, 2: 6-10 cell, 3: 10-15 cells, 4: more than 15 cells. Reepithelization 0: none, 1: formation of basal layer, 2: spongiosis epidermal differentiation, 3: granular epidermal differentiation, 4: epidermal migration. Neovascularization and presence of fibroblast and collagen 0: none, 1: mild, 2: moderate, 3: severe, 4: very severe.

### Immunoperoxidase test

Immunohistochemistry was performed using a commercial immunoperoxidase kit (Thermo Scientific, USA) to demonstrate superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) and Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in wound tissue according to the manufacturer's instructions by using diaminobenzidine (DAB) as the chromogen and Mayer's hematoxylin as the counterstain. Normal mouse serum was used in negative control instead of primary antibody during the staining procedure. To unmask antigens, tissue sections were placed in a microwave in citrate buffer (pH: 6.0), for 20 min at

the highest potency. Then, endogenous peroxidase activity was blocked by the use of 0,1% hydrogen peroxide in methanol for 10 min. Protein blocking was performed for 10 min. The sections were treated with appropriate primary antibody overnight in +4  $^{\circ}\text{C}$ . Sections were then incubated with secondary antibody and streptavidine for 15 min each. Sections were treated with DAB (Thermo Scientific, USA) for 10 min and counterstained with Mayer's hematoxylin. Immunopositive reactions were evaluated according to severity of staining as follows: 0: none, 1: mild, 2: moderate and 3: severe.

### Statistical Analysis

SPSS v15 (SPSS Inc. Chicago, Illinois, America) statistical program was used in the statistical analysis of this study. The data were tested for normality using a Shapiro-Wilk test and results showed that they did not meet the parametric test assumptions. Therefore nonparametric test was used. Histopathological information and wound measurements were evaluated by nonparametric test of Kruskal-Wallis test. In cases where significance was observed, paired comparisons of the groups were determined by performing the Mann-Whitney U test and  $P < 0.05$  was considered significant

## RESULTS

There were no significant difference between groups for body weight ( $p > 0.05$ ). When comparing wound diameters on the 3rd, 7th and 14th days within and between the groups, it was determined that each of them were statistically different compared to the next time point ( $p < 0.05$ ) (Table 1 and 2).

When the wound healing was examined macroscopically, it was noticed that there was no difference in wound lesions on the 3rd postoperative day in all groups. While the crust formed over the wounds in the EL and control group on the 7th day, there was no crust formation in the HOCL group.

On the 14th day controls, it was observed that the wounds improved close to closure, crust formation seen on the wound in the EL group, and the wound was completely closed without the crust formation in the HOCL group, and also there was only a scar line in some animals of HOCL group (Figure 3 and 4)...

**Table 1.** Comparison of wound sizes (mm<sup>2</sup>) in the postoperative healing period within the group

Time	Control	Hypochlorous acid	Ethacridine Lactate
Baseline	320,00 <sup>a</sup>	320,00 <sup>a</sup>	320,00 <sup>a</sup>
3	220±43 <sup>b</sup>	226±40 <sup>b</sup>	260±72 <sup>b</sup>
7	114±40 <sup>c</sup>	80±18 <sup>c</sup>	140±25 <sup>c</sup>
14	6±8 <sup>d</sup>	1±1 <sup>d</sup>	11±21 <sup>d</sup>
<b>P-Value*</b>	p≤0.002	p≤0,002	p ≤0,003

a,b,c,d: Differences between the groups denominated by different letters in the same coulum are significant. Data are presented as median±IR. 3 (postoperative 3rd day), 7 (postoperative 7th day), 14 (postoperative 14th day).

**Table 2.** Comparison of wound sizes (mm<sup>2</sup>) between groups in the postoperative healing period

Groups	3	7	14
Control	220±43	114±40a	6±8a
Hypochlorous acid	226±40	80±18b	1±1b
Ethacridine Lactate	260±72	140±25c	11±21a
<b>P-Value*</b>	p=0.22	p≤0.03	p≤0.009

a,b,c: Differences between the groups denominated by different letters in the same coulum are significant. Data are presented as median±IR. 3 (postoperative 3rd day), 7 (postoperative 7th day), 14 (postoperative 14th day).



**Figure 3.** Macroscopic view of hypochlorous acid group wounds at 7th and 14th days



**Figure 4.** Macroscopic view of ethacridine lactate group wounds at 7th and 14th days

### Histopathological examination

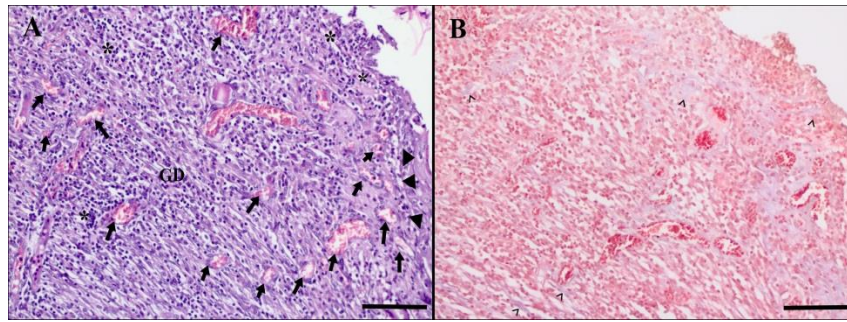
In the control group, there were marked infiltration of polymorph nuclear leukocytes (PMNL) and mild mononuclear cells with severe neovascularization in wound bed not covered by an epithelium (Figure 5). In HOCL group, inflammatory cells infiltration were determined but PMNL were replaced by

mononuclear cells. Also there were mild to moderate collagen fibers, less neovascularization with regressed blood vessels, reepithelization characterised by keratinocytes migration and bridging of cells (Figure 6). Histopathologic findings of EL group were similar to the control group although antiseptic (ethacridine lactate) was applied on wound. In this group, necrotic debris was observed on the surface accompanied by

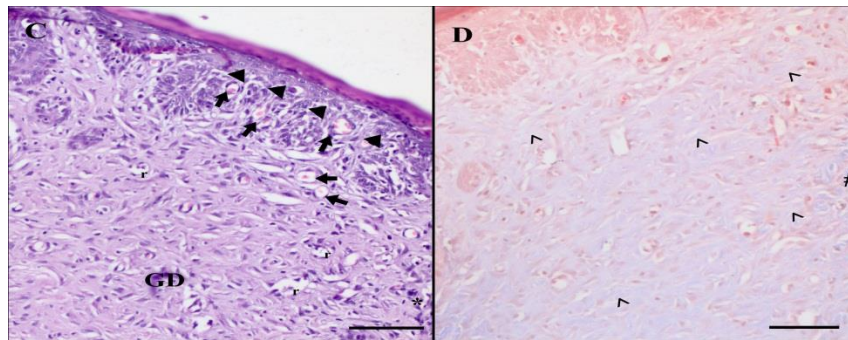


inflammatory cells. The wound beds were filled with inflammatory cells rich in neutrophil leucocytes and

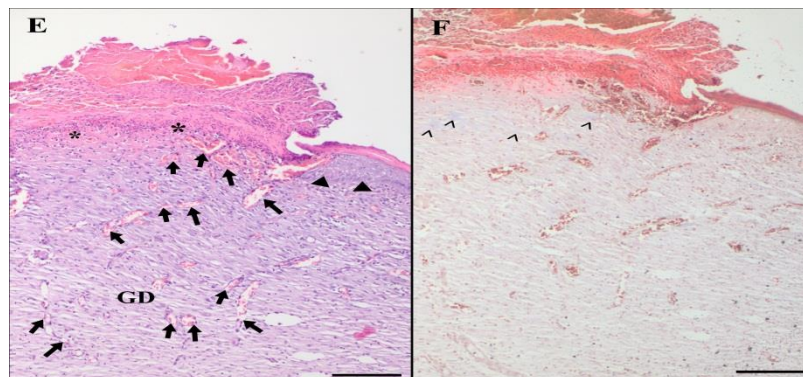
neovascularization. Also mild new collagen fibers were present (Figure 7)..



**Figure 5.** Control group, (A) Granulation tissue, intense neovascularization (arrow), epidermal proliferation (arrowhead), intense inflammatory cell infiltration(\*), Hematoxylin and Eosin (HE) staining, Bar = 60µm. (B) Juvenile collagen fibers (^),Masson's Trichrome staining, Bar = 60µm



**Figure 6.** Hypochlorous acid group, (C) Granulation tissue, mild neovascularization (arrow), blood vessel regression (r), epidermal proliferation (arrowhead), mild inflammatory cell infiltration (\*),Hematoxylin and Eosin (HE) staining, Bar = 60µm. (D) Juvenile collagen fibers (^), adult collagen fibers (#),Masson's Trichrome staining, Bar = 60µm.



**Figure 7.** Ethacridine lactate group, (E) Granulation tissue, intense neovascularization (arrow), epidermal proliferation (arrowhead), intense inflammatory cell infiltration(\*), Hematoxylin and Eosin (HE) staining, Bar = 100µm. (F) Juvenile collagen fibers (^),Masson's Trichrome staining, Bar = 100µm.

Statistical differences were determined as a result of histopathological evaluation of the wound line in

order to evaluate healing after sacrifice (p<0.05) (Table 3).

**Table 3.** Comparison of histopathological examination results between groups

Groups	Inflammatory cell	Reepithelization	Neovaskularization	Fibroblast	Collagen
Control	3±2 <sup>a</sup>	2±1	3±1	2±1 <sup>a</sup>	0±1
Hypochlorous acid	2±1 <sup>b</sup>	3±1	2±1	3±1 <sup>b</sup>	1±1
Ethacridine Lactate	3±1 <sup>a</sup>	2±2	3±1	2±0 <sup>a</sup>	1±1
<b>P-Value</b> *	p=0.03	p=0.08	p=0.09	p≤0.03	p=0.06

a,b: Differences between the groups denominated by different letters in the same coulum are significant. Data are presented as median±IR



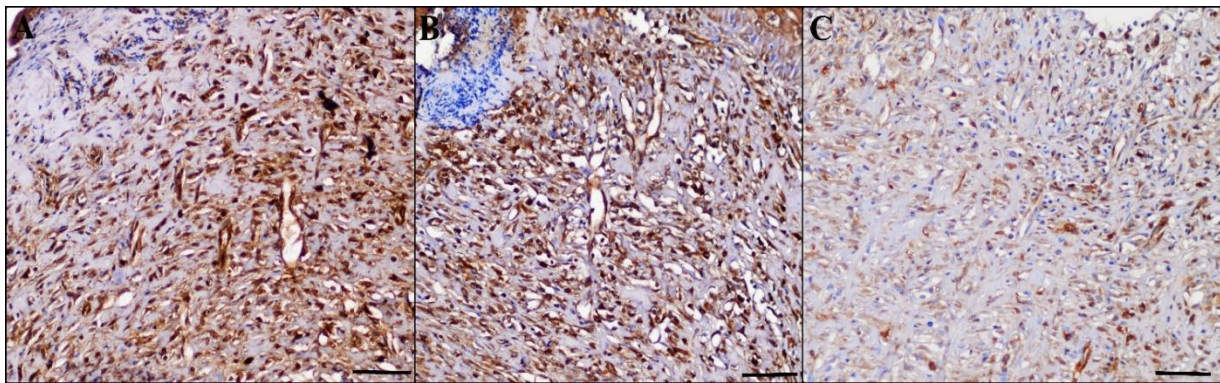
All primary antibodies in all groups showed immunohistochemical reactivity, and Table 4 gave their staining intensity according to the groups. According to results, the highest GPx immunoreactivity was observed in the control group and a continuously decrease of immunopositivity was observed in EL and HOCL group. There was a statistically significant difference in Gpx values between the groups. The lowest SOD immunoreactivity was found in the HOCL group and there was a significant difference compared to the other two groups (Figure 8 and 9). It has been observed that iNOS especially in HOCL group is

expressed at a moderate/severe level in both epidermal cells and newly formed young fibroblasts. However, the presence of the new iNOS expression was less in EL group and control group, respectively (Figure 10). The highest NF-κB immunopositivity was found in EL group. In EL group, moderate immunopositivity was observed in both of the newly formed epidermis and dermis, while in HOCL group, the new form of epidermis was observed in mild severity. In the control group, mild NF-κB immunopositive areas were observed in dermis (Figure 11).

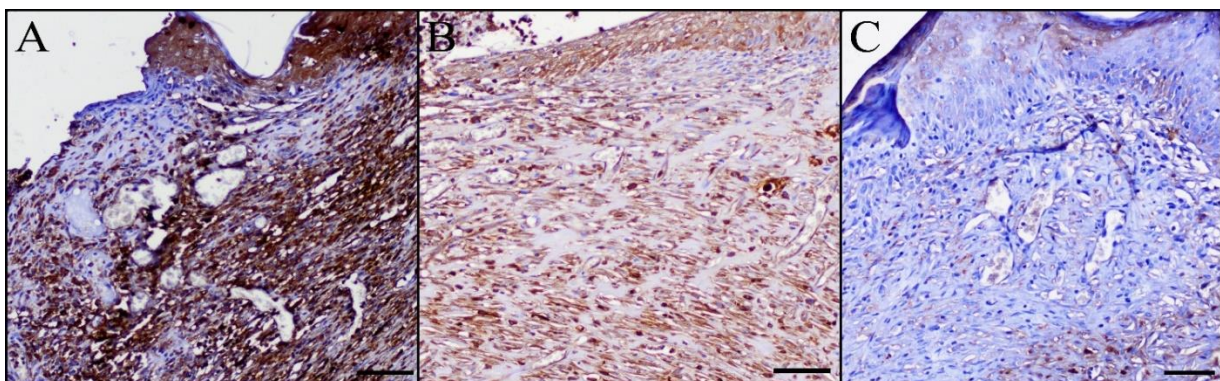
**Table 4.** Comparison of the immunohistochemical reactivity intensity between groups

Groups	SOD	GPx	NF-κB	iNOS
Control	3±0 <sup>a</sup>	3±1 <sup>a</sup>	2±1	2±1
Hypochlorous acid	2±1 <sup>b</sup>	1±1 <sup>b</sup>	1±1	2±1
Ethacridine Lactate	3±1 <sup>a</sup>	2±0 <sup>c</sup>	2±1	2±2
<b>P-Value*</b>	p≤0.04	p≤0.03	P=0.5	P=0.2

a,b: Differences between the groups denominated by different letters in the same column are significant. Data are presented as median±IR SOD (Superoxide dismutase), GPx (Glutathione peroxidase), NF-κB (Nuclear Factor kappa B), iNOS (Inducible nitric oxide synthase)

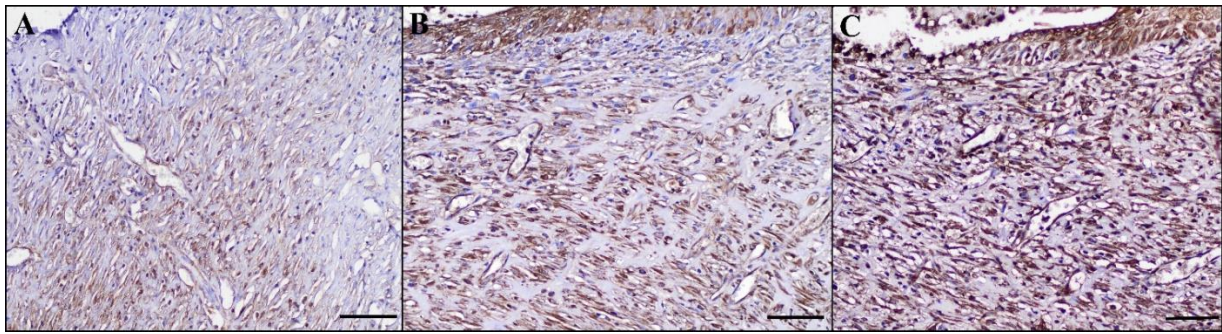


**Figure 8.** (A) Control group, severe SOD immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm, (B) Ethacridine lactate group, moderate/severe SOD immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm, (C) Hypochlorous acid group, moderate SOD immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm

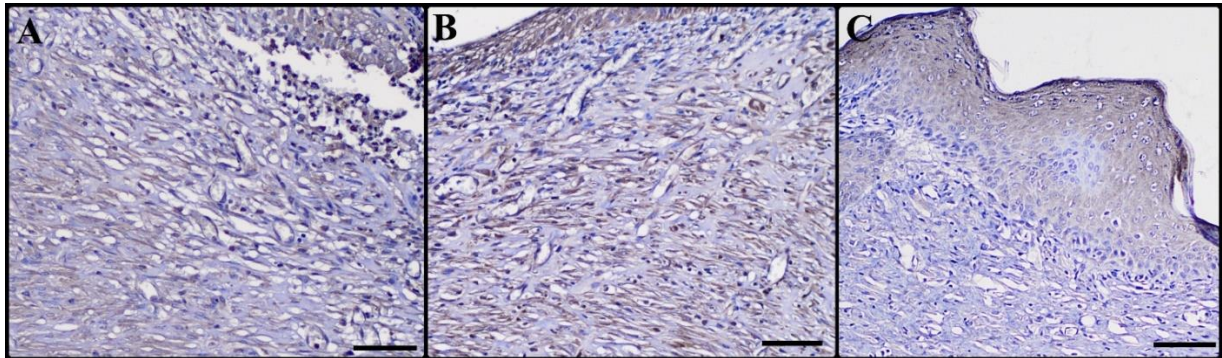


**Figure 9.** (A) Control group, severe GPx immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm, (B) Ethacridine lactate group, moderate GPx immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm, (C) Hypochlorous acid group, mild GPx immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200µm





**Figure 10.** (A) Control group, mild iNOS immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200 $\mu$ m, (B) Ethacridine lactate group, moderate iNOS immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200 $\mu$ m, (C) Hypochlorous acid group, moderate/severe iNOS immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200 $\mu$ m



**Figure 11.** (A) Control group, mild NF- $\kappa$ B immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 100 $\mu$ m, (B) Ethacridine lactate group, moderate NF- $\kappa$ B immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200 $\mu$ m, (C) Hypochlorous acid group, mild NF- $\kappa$ B immunoreactivity, DAB chromogen and hematoxylin counterstain, Bar = 200 $\mu$ m

## DISCUSSION

In physiological wound healing, a balance is achieved between new tissue formation and degeneration through apoptosis and reshaping of the extracellular matrix (Bucko et al. 2015). If a physiological problem occurs during the wound healing process, persistent inflammation, excessive collagen synthesis or insufficient matrix degradation and remodeling occur. As a result of these, excessive scar formation is seen in the wound (Gauglitz et al. 2011). Topical antiseptics are preferred more due to the bacterial resistance that may occur in the use of topical antibiotics on the wound, and it is reported that they are used locally to prevent infection, reduce inflammation and induce healing. Dakin solution, sodium hypochlorite (NaOCl), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, acetic acid and povidone iodine are considered cytotoxic, although they have a broad spectrum of action against fungi and bacteria (Armstrong and Bornstein 2003, Leaper et al. 2012). It has been reported that EL which is an acridine derivative, is a non-toxic antiseptic and can be used safely in wound healing (Dale 1946). In a study, EL was used in open wounds of cats and it was reported that as a result, a moist environment was created on the wound, debridement accelerated, granulation tissue was formed and a successful cicatrization was achieved accordingly (Apaydin and Gedikli 2019). There are many studies to investigate the effect of HOCL on wound management. Easy to

use, convenient, cheap, painless and safe for the treatment of infected acute traumatic wounds and providing rapid closure of surgical wounds provides an advantage over other antiseptics (Selkon et al. 2006, Gauglitz et al. 2011). It is reported that HOCL were effective in preventing scar formation on the wound. In addition, thanks to its anti-inflammatory effect, it reduces the pain and odor usually associated with wounds (Sampson and Muir 2002, Gold et al. 2017). HOCL controls bacterial density without inhibiting wound healing and it is available in spray and solution forms. (Morris 1966). It is reported that the pH of the wound should be less than 7.4 in order to carry oxygen from red blood cells to the wound area (Schneider et al. 2007). PH less than 6.5 provides a positive effect on wound healing. In chronic wounds, the pH is in the range of 7.25-8.9 (Percival et al. 2014). Previous studies have reported that the wound shrinks, epithelization accelerates, bacterial growth is inhibited and protease activity slows down at low wound pH (Gethin et al. 2008, Nagoba et al. 2017). In parallel with the previous studies, it was determined that a bacterial infection did not occur on the wound when using of neutral pH antiseptics, and the full layer skin wound with critical wound defect closed within 14 days. Macroscopic findings showed that the wound was completely closed in the HOCL group at the end of 14 days, and this situation was associated with better reepithelization and healing in the wound depending on the fibroblast density in the

HOCL group. The low amount of inflammatory cells in the HOCL group and the recovery without formation of excess scar tissue at the 7th day controls when the wound is healing are associated with anti-inflammatory effect of HOCL.

Wound healing is a complex and well-regulated mechanism, and successful wound healing requires activation of three interrelated stages (inflammation, proliferation and remodeling) which are performed by platelets, leukocytes, fibroblasts and keratinocytes. Keratinocytes, which are the main cellular component of the epidermis, are very important not only for barrier formation but also for wound restoration by taking part in epithelization. Platelets facilitate homeostasis and the release of growth factors, and then leukocytes participate in the inflammatory process. Fibroblasts and keratinocytes play a critical role in wound healing by increasing reepithelization and extracellular matrix remodeling (Hynes 2009). One of the biggest advantages of using animal models in wound healing is that it provides the opportunity to follow the wound healing process histologically and also conduct macroscopic, biochemical and biomechanical measurements (Gottru et al. 2000). In many studies, many parameters such as scars, edema, fibrin coagulation, neutrophil infiltration proliferation, white blood cells, inflammatory cells such as macrophages, fibroblast proliferation, angiogenesis, granulation tissue, reepithelization and collagen proliferation in the wound were examined for histological evaluation (O'Meara et al. 2001). It is reported that a clean wound should heal or show signs of healing within two to four weeks (Monaco and Lawrence 2003). Histopathological examinations were performed to evaluate similar parameters in this study. A full layer skin wound was created and at the end of the postoperative 14th day, it was observed that the wounds healed in a similar way as explained in the literatures. Although excessive fibroblast proliferation in HOCL group, there were no statistical differences in reepithelization. However, in millimetric measurements of the wound, it is seen that the wound was closed in direct proportion to the fibroblast density in the HOCL group. When we evaluated the reepithelization values in groups, it is thought that although more reepithelialization is seen in the HOCL group, the reason for the lack of statistical difference may be related to the insufficiency in the number of animals used in the study or the fact that antiseptics, which are strong enough to damage the bacteria, damage epithelial cells (Kramer 1999).

It is reported that collagen production starts on the 7th day in wound healing and continues until the end of the proliferation phase. During this period, the amount of collagen in the wound increases constantly. It is stated that there is a decrease in the amount of collagen with the end of the proliferation phase, and if the amount of collagen in the wound is intense at the end of this period, this situation may be

related to the prolongation of the proliferative phase (Guthrie et al. 2012). In this study, there was no statistically significant difference in the amount of collagen between the groups in the histopathological examinations at the end of the 14th day, the amount of collagen was remarkably low in the control group. When a relationship was established between the excess amount of inflammatory cells and the amount of collagen in the control group, it was thought that the inflammation phase was longer in the control group and the proliferation phase started later than the other groups.

A normal wound healing consists of 4 stages; hemostasis, inflammation, proliferation and maturation and remodeling. Especially in the inflammation stage, the inflammatory cells come to the region and secrete various cytokines and reactive oxygen species (Wells et al. 2016). These reactive oxygen species directly attack and destroy pathogens in the wound area. But, excessive production of superoxide or prolongation of the inflammation phase also damages surrounding tissues. Superoxide is split into hydrogen peroxide and molecular oxygen with the help of superoxide dismutase. Hydrogen peroxide is detoxified with peroxidase such as glutathione peroxidase and catalase (Kurahashi and Fujii 2015). At this stage, the presence of superoxide dismutase and glutathione peroxidase indicates the inflammation process is ending. In this study, it was observed that SOD and GPx expressions were less in EL group and HOCL group. These expressions were especially less in HOCL group as compared to the control group at the end of the inflammatory process and the start of the proliferation phase. Healthy and young rats were used in this study. Presuming that they have a normal wound healing process, it has been observed that HOCL contributes to accelerating the wound healing process.

It is known that NF- $\kappa$ B expression during the wound healing process increases the secretion of iNOS with proinflammatory cytokines such as interleukin-1 and interleukin-6 and plays a role in both the inflammation phase and the reepithelization phase with its proliferative effect (Jobin and Sartor 2000, Na et al. 2016). In the presented study, it was noted that although NF- $\kappa$ B immunopositivities were found in both the newly formed epithelium and epidermis in all groups, immunopositive areas in HOCL group were mostly associated with keratinocytes in the epithelial layer.

Schaffer et al. (1999) has demonstrated direct connection of collagen synthesis with iNOS expression. In the presented study, a correlation was observed between iNOS immunopositivity and the presence of collagen.

A small number of animals were used in this study, and the wound healing process was evaluated using histopathological and macroscopic data alone. Despite these limitations, wound healing was faster in HOCL group after 14 days compared to control and



EL group. However, when we examined the physiological process, we observed that wound healing with the use of HOCL occurred within the expected time.

As a result of this study, it was observed that wound healing was performed faster in animals treated with HOCL compared to EL and control group. There was no negative effect of HOCL on wound healing. On the other hand, it has been determined that when nothing is applied to the wound or when EL is applied, wound healing may be delayed due to the long proliferation time.

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

**Ethical permission:** The study was approved by Kirikkale University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision no. 2019/47.

**Acknowledgement:** This research article was summarized from Yahia ALHBOU's MSc. thesis.

## REFERENCES

**Abramov Y, Golden B, Sullivan M, Botros SM, Miller JJ, Alshahrour A, Goldberg RP, Sand PK (2007)** Histologic characterization of vaginal surgical wound healing in a rabbit model. *Wound Repair Regen.* 2007;15(1):80-86.**vs. abdominal**

**Apaydin B, Gedikli S.** Wound healing effects of Nigella sativa L. essential oil in streptozotocin induced in diabetic rats. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences.* 2019;7(3):30-40.

**Aratani Y.** Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi.* 2006;47(3):195-199.

**Armstrong LC, Bornstein P.** Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biology.* 2003;22(1):63-71.

**Bongiovanni CM.** Nonsurgical management of chronic wounds in patients with diabetes. *J Vasc Ultrasound.* 2006;30(4):215-218

**Bucko AD, Draelos Z, Dubois JC, Jones TM.** A double-blind, randomized study to compare Microcyn scar management hydrogel, K103163, and Kelo-cote scar gel for hypertrophic and keloid scars. *Dermatologist.* 2015;23(9):113-122.

**Chai TY, Kim WB.** Bactericidal Effect of Disinfectant a Super-oxidized Water, Medilox. *Korean J Nosocomial Infect Control.* 1998;3(1):1-6.

**Dale HE.** Recent Development in Wound Antiseptics. *Post Graduate Medical Journal.* 1946; 22(246):118-121.

**Ferguson A.** Best Performer. *Nurs Times.* 1988; 84(14):52-55.

**Gauglitz GG, Korting HC, Pavicic T, Ruzicka T, Jeschke MG.** Hypertrophic scarring and keloids: pathomechanisms and current and emerging treatment strategies. *Molecular medicine.* 2011;17(1-2):113-125

**Gethin GT, Cowman S, Conroy RM.** The impact of Manuka honey dressings on the surface pH of chronic wounds. *International Wound Journal.* 2008;5(2):185-194.

**Gold MH, Andriessen A, Dayan SH. et al.** Hypochlorous acid gel technology its impact on post procedure treatment and scar prevention. *J Cosmet Dermatol.* 2017; 16(2):162-167.

**Gottru F, Agren MS, Karlsmark T.** Models for use in wound healing research: a survey focusing on in vitro and in vivo adult soft tissue. *Wound Repair Regen.* 2000;8(2):83-96.

**Guthrie KM, Agarwal A, Tackes DS, Johnson KW, Abbott NL, Murphy CJ, Mcanulty JF.** Antibacterial efficacy of silver-impregnated polyelectrolyte emulsiy immobilized on a biological dressing in a murine wound infection model. *Annals of surgery.* 2012;256(2): 371-377

**Hynes RO.** The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science.* 2009;326(5957):1216-1219.

**Jobin C, Sartor RB.** The I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278(3):451-462.

**Kramer SA.** Effect of povidone-iodine on wound healing: a review. *Journal of Vascular Nursing.* 1999;17(1): 17-23.

**Kurahashi T, Fujii J.** Roles of Antioxidative Enzymes in Wound Healing. *J. Dev. Biol.* 2015;3(2):57-70.

**Leaper D, Ayello EA, Carville K, Fletcher J, Keast D, Lindholm C, Martinez JLL, Mavanini SD, McBain A, Moore Z, Opananon S, Pina E.** Appropriate use of silver dressings in wounds. Ed; MacGregor L. *International Consensus Document. Wounds international, London, 2012; pp. 1-24.*

**Marcinkiewicz J, Chain B, Nowak B, Grabowska A, Bryniarski K, Baran J.** Antimicrobial and cytotoxic activity of hypochlorous acid: interactions with taurine and nitrite. *Inflamm Res.* 2000;49(6):280-289.

**Mckenna SM, Davies KJA.** The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochemical J.* 1998;254(3), 685-692.

**Monaco JL, Lawrence WT.** Acute wound healing: an overview. *Clinics in plastic surgery.* 2003;30(1):1-12.

**Morris JC.** The acidionization constant of HOCL from 5 to 3.5. *The Journal of Physical Chemistry.* 1966;70(12): 3798-3805.

**Na J, Lee K, Na W, Shin JY, Lee MJ, Yune TY, Lee HK, Jung HS, Kim WS, Ju BG.** Histone H3K27 demethylase JMJD3 in cooperation with NF- $\kappa$ B regulates keratinocyte wound healing. *J Invest Dermatol.* 2016;136(4):847-858.

- Nagoba B, Davane M, Gandhi R, Wadher B, Suryawanshi N, Selkar S.** Treatment of skin and soft tissue infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*-A review of our experiences with citric acid over the past 20 years. *Wound Medicine*. 2017; 19:5-9.
- O'meara SM, Cullum NA, Majid M, Sheldon TA.** Systematic review of antimicrobial agents used for chronic wounds. *Br J Surg*. 2001;88(1):4-21.
- Percival SL, Mccarty S, Hunt JA, Woods EJ.** The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair and Regeneration*. 2014;22(2):174-186.
- Reinhardt CS, Geske T, Schmolz M.** Atopical wound disinfectant (ethacridinellactate) differentially affects the production of immune regulatory cytokines in human whole-blood cultures. *Wounds*. 2005;17(8):213-221.
- Sampson MN, Muir AV.** Not all super-oxidized water sare the same. *J Hosp Infect*. 2002;52(3):228-229.
- Schaffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A.** Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg*. 1999;165(3):262-267.
- Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J.** Influence of pH on wound-healing: a new perspective. *Arch Dermatological Res*. 2007;298:413-420.
- Selkon JB, Cherry GW, Wilson JM, Hughes MA.** Evaluation of hypochlorous acid washes in the treatment of chronic venous leg ulcers. *Journal of wound care*. 2006;15(1): 33-37.
- Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T.** Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A simple method. *Chemotherapy*. 1997;43(5):340-345.
- Visser MC, Winterbourn CC.** Oxidation of intracellular glutathione after exposure of human red blood cells to hypochlorous acid. *Biochem J*. 1995; 307(1):57-62.
- Wainwright M.** Acridine – a neglected antibacterial chromophore. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47 (1):1-13.
- Wells A, Nuschke A, Yates CC.** Skin tissue repair: Matrix microenvironmental influences. *Matrix Biol*. 2016;49:2536.
- Zeng XP, Tang WW, Ye GQ, Ouyang T, Tian L, Yaming N, Ping L.** Studies on disinfection mechanism of electrolyzed oxidizing water on *E. Coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci*. 2010;75(5):253-260.

## The Treatment of Tracheal Rupture and Generalized Subcutaneous Emphysema in A Dog

Fatma GÖRÜCÜ<sup>1\*</sup>, İbrahim DEMİRKAN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Surgery Department, 03200, Afyonkarabısar, Turkey

### ABSTRACT

Potentially life-threatening tracheal injuries are not commonly observed in dogs and usually occur due to bite wounds, gunshot wounds, and collar-chain injuries that form on the cervical part of the trachea, and are an important type of wound that requires surgical intervention. The defect in the trachea should be repaired with surgical interventions. If this defect is not repaired, secondary subcutaneous emphysema occurs. The subcutaneous emphysema that develops may be limited to the perithracheal region only or may spread to all subcutaneous areas of the body. This case report presents the diagnosis and treatment of a dog with tracheal rupture and generalized emphysema, associated with dog fight.

**Keywords:** Dog, emphysema, tracheal rupture

\*\*\*

### Bir Köpekte Trahea Rupturu ve Generalize Subkutan Amfizemin Tedavisi

### ÖZ

Potansiyel olarak hayati risk taşıyan trahea yırtıkları köpeklerde yaygın olarak gözlenmez ve genellikle traheanın servikal kısmında şekillenen ısırık yaraları, ateşli silah yaralanmaları ve tasma-zincir yaralanmalarına bağlı olarak ortaya çıkar ve cerrahi müdahale gerektiren önemli bir yara çeşididir. Traheadaki defekt operatif müdahaleler ile onarılmalıdır. Bu defekt onarılmaz ise sekonder olarak subkutanöz amfizem meydana gelir. Şekillenen subkutanöz amfizem sadece peritraheal bölgede sınırlı kalabilir ya da vücudun bütün subkutanöz alanlarına yayılabilir. Bu vaka takdimi köpek kavgası ilişkili traheal ruptur ve generalize amfizem tespit edilen bir köpeğin tanısı ve tedavisini ortaya koymak amacıyla yapılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Amfizem, köpek, traheal ruptur

To cite this article: Görücü F, Demirkan İ. The Treatment of Tracheal Rupture and Generalized Subcutaneous Emphysema in A Dog. Kocatepe Vet J. (2021) 14(3): 376-381

Submission: 16.06.2021 Accepted: 23.08.2021 Published Online: 01.09.2021

ORCID ID; FG: 0000-0001-7630-0788, İD: 0000-0002-0908-8331

\*Corresponding author e-mail: fatmagorucu@gmail.com

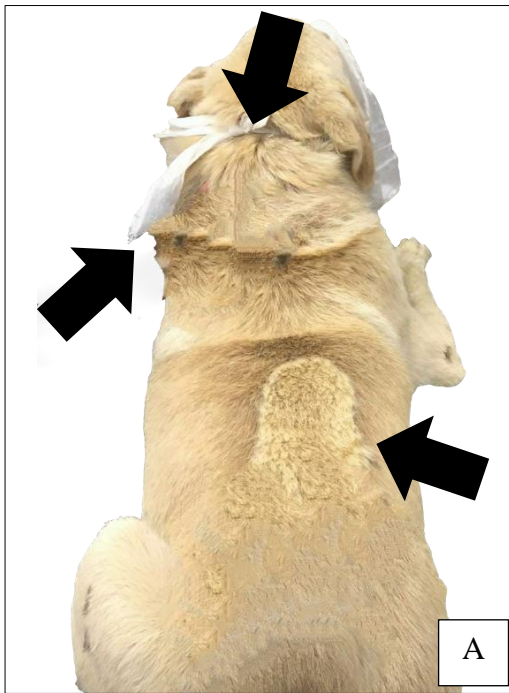
## INTRODUCTION

Tracheal injuries are a rare and potentially life-threatening wound that requires surgical intervention (Kellagher and White, 1987; Rousie et al., 2004). It occurs due to bite wounds, gunshot injuries, and collar-chain injuries, which generally take place in the cervical part of the trachea (Kellagher and White 1987; Nikahval et al. 2015). It can also be formed as a complication of endotracheal intubation (Hardie et al. 1999; Mitchell et al. 2000; Kastner et al. 2004). It has been reported that such injuries in wild animals occur mostly as a result of car accidents and animal fights (Kumar et al. 2016).

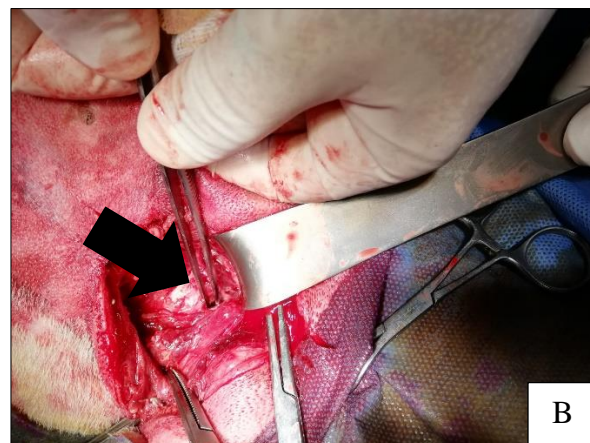
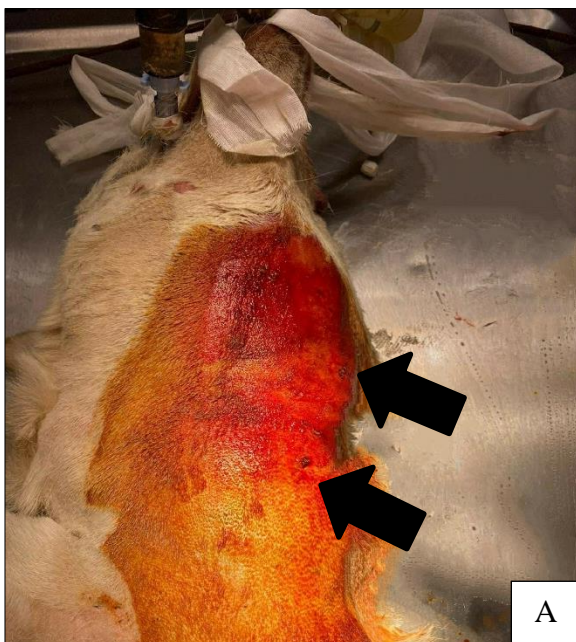
Owing to the intraluminal accumulation of blood and tissue debris caused by severe injuries and tracheal displacement, obstruction in the respiratory tract and respiratory failure occurs. Eventually, death may be a consequence (Kellagher and White 1987; Basdoni et al. 2016). Where necessary, tracheotomy should be performed for emergency intervention (Kellagher and White 1987). The defect in the trachea is repaired with surgical management (Rousie et al. 2004). If not repaired, secondary subcutaneous emphysema takes place. The developing subcutaneous emphysema may be limited only to the peritracheal region or spread to all subcutaneous areas of the body. Diagnosis is made by anamnesis, clinical findings, and lateral cervical radiography (Bauer and Currie, 1988; Nikonval et al. 2015; Kumar et al. 2016).

## CASE HISTORY

A 2-year-old male 25,7 kg cross-breed dog was presented to the small animal veterinary clinic, Application and Research Center of Veterinary Health, University of Afyonkocatepe. The owner of the dog stated that the dog was bitten by another dog two days before admission, and swelling was formed all over his body. As a result of the clinical examinations, the body temperature was 38.9°C, the respiratory rate and heart rate per minute were 60 and 88, respectively. Bite wound on the neck (Figure 2) and generalized subcutaneous emphysema covering the neck and cranial part of thorax particularly around both scapulas were detected (Figure 1). A complete blood count (HumaCount 80TS, Vet Mode, Germany) was measured (Table 1). Radiographic examination revealed a rupture in the cervical region of the trachea and subcutaneous emphysema (Figure 1). The dog treated with oxygen prior to surgical intervention. The animal was oro-tracheally intubated after induction with propofol. Anesthesia was maintained with 2.0% Isoflurane delivered in %100 oxygen. Dog was placed in the dorsal recumbency. The affected region of the neck was shaved and prepared for surgery following the aseptic technique. The trachea was reached by making an incision from the area where the wound was located. Bruises and bleeding in the sternocephalicus and sternohyoideus muscles were detected. Ruptured sixth tracheal ring and seventh tracheal ring were sutured together with absorbable suture material (2/0, Polyglycolic acid) by simple interrupted suture pattern. Muscles, subcutaneous tissue, and skin were closed routinely. In the postoperative period, Cefazolin sodium (25 mg/kg, BID, IM, 7 days, Meloxicam (0,2 mg/kg, SID, 3 days) and povidone-iodine (10%) solution for wound care were recommended. One week after the surgery, complete recovery was observed (Figure 3).



**Figure 1:** **A.** Preoperative clinical appearance of the dog (black arrows: generalized subcutaneous emphysema), **B.** Preoperative radiography (white asterisks: subcutaneous emphysema areas).



**Figure 2:** **A.** Bite wounds in the neck (black arrows) **B.** Tear in the trachea (black arrows)

**Table 1.** Complete blood count results

Complete Blood Count		
Parameter	Value	Reference range (Zimmerman et al. 2011)
WBC ( $10^3/\mu\text{L}$ )	10.38	6.00-17.00
Lymph ( $10^3/\mu\text{L}$ )	2.60	1.00-4.80
Mon ( $10^3/\mu\text{L}$ )	0.29	0.20-1.50
Gran ( $10^3/\mu\text{L}$ )	7.48	3.00-12.00
Lymph (%)	25.1	12.0-30.0
Mon (%)	2.8	2.0-4.0
Gran (%)	72.1	62.0-87.0
RBC ( $10^6/\mu\text{L}$ )	6.53	5.50-8.50
HGB (g/dL)	14.8	12.0-18.0
HCT (%)	39.68	37.00-55.00
MCV (fL)	60.7	60.0-77.0
MCH (pg)	22.7	19.5-24.5
MCHC (g/dL)	37.3	31.0-38.0
RDW (%)	12.6	
PLT ( $10^3/\mu\text{L}$ )	402	200-500
MPV (fL)	6.6	3.9-11.1
PDW (%)	36.6	
PCT (%)	0.27	



**Figure 3:** **A.** Clinical appearance of the dog on Postoperative 7th day, **B.** Lateral cervical radiography of the dog on Postoperative 7th day.

## DISCUSSION and CONCLUSION

This case report was to evaluate the diagnosis and treatment of a dog with tracheal rupture and generalized subcutaneous emphysema.

Injuries that result in tracheal rupture are uncommon in dogs (Kellagher and White 1987), however penetrating injuries are among serious cases regardless of the cause (Risselada 2017). Tracheal rupture can be emergent event as a result of traumas formed in the cervical part of the trachea, and mostly seen as a result of bites during fights, injuries by firearms, car accidents, and excessive tightening of the leash chains (Kellagher and White 1987; Nikonval et al. 2015; Kumar et al. 2016). It has been reported that bite wounds as a result of fights mostly occur on the head and cervical areas (Basdani et al. 2016). Results of tracheal injuries vary according to the severity and location of the lesion. While crush wounds without penetration are not common and rarely cause acute respiratory obstruction, fractures in the tracheal rings can lead to life threatening chronic stenosis (Kellagher and White 1987).

Generalized subcutaneous emphysema can emerge by traumatic, iatrogenic, or spontaneous reasons, but tears in the tracheobronchial region often lead to generalized subcutaneous emphysema. In all animals with generalized subcutaneous emphysema, tracheal tears should be suspected as a cause (Bauer and Currie 1988; Nikonval et al. 2015). As a result of bite wounds, crushing, tearing, tissue loss, respiratory system problems can be detected. However, subcutaneous emphysema and later pneumomediastinum can be observed with respect to the air leaking from the perforated trachea reaching the paratracheal tissue. While subcutaneous emphysema can often be observed following such injuries, the extent of emphysema may be limited only to the surrounding tissues or spread to the whole body (Kellagher and White 1987; Risselada 2017). Subcutaneous emphysema and pneumomediastinum can also be observed when there is air leakage from the cervical trachea (Kellagher and White 1987).

Detection of tracheal perforations with subcutaneous emphysema can sometimes be difficult (Basdani et al. 2016), however, the diagnosis of tracheal rupture is easy, especially in cases with clear history. The presence of subcutaneous emphysema with progressive pneumomediastinum is a specific indicator of a leak in the upper respiratory tract. In cases of cough or whistling sounds, the location of the lesion can be determined by auscultation (Kellagher and White 1987). In cases where tracheal perforations are formed, direct or indirect paratracheal air accumulation, subcutaneous or deep facial emphysema, and pneumomediastinum may occur. Complete tracheal rupture or displacement can be seen in regional disorders (Basdani et al. 2016).

While the wound area can be detected clearly from the outside in patients, sometimes injuries may not be detected (Risselada 2017). Clinical findings include sudden onset of cough and difficulty in breathing (Rousie et al. 2004). Although large tears in the trachea can be seen on radiography, different diagnostic techniques can be used with radiography in minor injuries (Kellagher and White 1987). Radiography is the primary method that shows the degree of injury and tissue damage. Pleural effusion can be determined by ultrasonography of the thoracic region, but ultrasonographic imaging may be difficult due to the air in the subcutaneous tissue (Rousie et al. 2004; Risselada 2017). However, tracheal stenosis in the tracheal lumen can also be detected by positive contrast radiography or computed tomography (Basdani et al. 2016). In addition, it has been reported that it would be useful to detect foaming by pouring sterile 0.9% saline solution into the suspected area where the tracheal rupture is formed (Kumar et al. 2016). Obtaining latero-lateral and ventrodorsal radiographs of the cervical region, thorax, and abdominal region would be useful in detecting subcutaneous emphysema (Basdani et al. 2016).

Tracheal rupture requires urgent intervention and treatment should be initiated emergently (Kumar et al. 2016). Emergency surgery is the treatment of choice in most cases. Endotracheal intubation should be used when necessary (Rousie et al. 2004; Basdani et al. 2016; Manchi et al. 2016). While small, perforated wounds of the trachea can heal on their own, treatment can be performed by debridement of the underlying tissues with surgical interventions. However, the risk of stenosis can be reduced by resection and anastomosis of tracheal rings in large tear wounds or crush wounds (Kellagher and White 1987; Risselada 2017). In addition, the use of tissue adhesives can be used to remove small tracheal openings in acute conditions (Kumar et al. 2016). In addition, tears, tensions, bruises, losses in the skin and underlying tissues can be detected (Basdani et al. 2016). The split cartilage technique can be used to perform tracheal resection and anastomosis in severe cases. It has been reported that this technique is beneficial against the formation of stenosis (Basdani et al. 2016). In cases where lesions are larger than 2 cm and in cases with diffuse subcutaneous emphysema and respiratory distress, early surgical intervention is essential (Kastner et al. 2004). In medical treatment, it has been reported that continuous moistening of the respiratory tract and the use of broad-spectrum antibiotics would be beneficial (Rousie et al. 2004). In present case ruptured sixth tracheal ring and seventh tracheal ring were sutured together.

In this case report, uneventful recovery of a dog with a tracheal rupture as a result of surgical intervention was discussed.

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

**Ethical Approval:** This study is not subject to the permission of HADYEK in accordance with the “Regulation on Working Procedures and Principles of Animal Experiments Ethics Committees” 8 (k). The data, information and documents presented in this article were obtained within the framework of academic and ethical rules.

## KAYNAKLAR

- Basdani E, Papazoglou LG, Patsikas MN, Kazakos GM, Adamama-Moraitou KK, Tsokataridis I.** Upper airway injury in dogs secondary to trauma: 10 dogs (2000-2011). *J Am Anim Hosp Assoc.* 2016; 52(5):291-296.
- Bauer MS, Currie J.** Generalized subcutaneous emphysema in a dog. *Can Vet J.* 1988; 29:836-837.
- Hardie EM, Spodnick GJ, Gilson SD, Benson JA, Hawkins, EC.** Tracheal rupture in cats: 16 cases (1983-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 1999; 214(4):508-512.
- Kästner SB, Grundmann S, Bettschart-Wolfensberger R.** Unstable endobronchial intubation in a cat undergoing tracheal laceration repair. *Vet Anaesth Analg.* 2004; 31(3):227-230.
- Kellagher REB, White RAS.** Tracheal rupture in a dog. *J Small Anim Pract.* 1987; 28:29-38.
- Kumar PR, Sreenu M, SAilaja B, Raju DB.** Management of tracheal rupture in a pup with n-butyl cyanoacrylate glue - a case report. *J Livest Sci.* 2016; 7:192-195.
- Manchi G, Brunenberg MM, Shahid M, Aiyan AA, Brunenberg L, Stein S.** Larynx trauma and hyoid bone fracture after bite injury in dog: Case report. *Front vet sci.* 2016; 3(64):1-7.
- Mitchell SL, McCarthy R, Rudloff E, Pernell RT.** Tracheal rupture associated with intubation in cats: 20 cases (1996–1998). *J Am Vet Med Assoc.* 2000; 216(10):1592-1595.
- Nikahval B, Foroud M, Raayat JA, Ahrari-Khafi MS.** Generalized subcutaneous emphysema caused by concurrent cricoid cartilage fracture and cricotracheal detachment in a German shepherd dog. *Iran J Vet Res.* 2015; 16(2):226-228.
- Risselada M.** Perforating cervical, thoracic, and abdominal wounds. *Vet Clin Small Anim.* 2017; 47(6):1135-1148.
- Rousie C, Van Damme H, Radermecker MA, Reginster P, Tecqmenne C, Limet R.** Spontaneous tracheal rupture: A case report. *Acta Chir Belg.* 2004; 104(2):204-208.
- Zimmerman KL, Moore DV, Smith AS.** Species Specific Hematology, In: Schalm's veterinary hematology, Ed; Weiss DJ, Wardrop KJ, 6th Ed., John Wiley & Sons, Iowa, USA. 2011; pp. 863-864.



## 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](http://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, 7<sup>th</sup> 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](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.