



**TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**

Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY

**LABORATUVAR
HAYVANLARI
BİLİMİ VE
UYGULAMALARI
DERGİSİ**

**JOURNAL OF
LABORATORY ANIMAL
SCIENCE AND
PRACTICES**

ISSN 2791-8645

Eylül/September 2022

Cilt/Volume 02

Sayı/Issue 02

Lab Hayv Bil Uyg & Derg / J Lab Anim Sci & Pract
jlasp@atauni.edu.tr



**TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**
Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ
JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

J Lab Anim Sci & Pract

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ

Lab Hayv Bil & Uyg Derg

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp>

EYLÜL/ SEPTEMBER

YIL / YEAR 2022

CİLT / ISSUE: 02

SAYI / NUMBER: 02



**TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**
Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY
LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ
JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

EDITORIAL BORD

EDITOR-in-CHIEF

Associate Professor Hakan AYDIN

Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, Erzurum, Turkey e-mail: jlasp@atauni.edu.tr Phone: +904423448763

ENGLISH EDITOR

Assoc.Prof. Dr. Emrah Hicazi AKSU
Kastamonu University, Faculty of Veterinary
Medicine,
Department of Reproduction and Artificial
Insemination, Kastamonu, Turkey e-mail:
emrahaksu@kastamonu.edu.tr

STATISTICS EDITOR

Assist. Prof. Dr. Ömer ELTAS
Atatürk University, Faculty of Veterinary
Medicine,
Department of Biometrics, Erzurum, Turkey e-mail: omer.eltas@atauni.edu.tr

SECTION EDITOR

Assist. Prof. Dr. Nergis ULAŞ
Atatürk University, Faculty of Veterinary
Medicine, Department of Internal Medicine,
Erzurum, Turkey
e-mail: nergisulas@atauni.edu.tr

SECTION EDITOR

Assist. Prof. Dr. Rukiye SEVİNÇ ÖZAKAR
Atatürk University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology,
Erzurum, Turkey
e-mail: rukiyeso@atauni.edu.tr

SECTION EDITOR

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Özkan TİMURKAN
Atatürk University, Faculty of Veterinary
Medicine, Department of Virology, Erzurum,
Turkey
e-mail: motimurkan@atauni.edu.tr

SECTION EDITOR

Assist. Prof. Dr. Emrah ÖZAKAR
Atatürk University, Faculty of Pharmacy,
Department of Pharmaceutical Technology,
Erzurum, Turkey
e-mail: emrahozakar@atauni.edu.tr

SECTION EDITOR

Prof. Dr. Başak HANEDAN
Atatürk University, Faculty of Veterinary
Medicine, Department of Internal Medicine,
Erzurum, Turkey
e-mail: basak.hanedan@atauni.edu.tr

EDITORIAL BOARD MEMBERS / SCIENTIFIC COMMITTEE

Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ, TÜRKİYE/TURKEY
Dr. Osman AKTAŞ, TÜRKİYE/TURKEY
Dr. Küşver MAMEDOVA, AZERBEYCAN/AZERBAIJAN
Dr. Volkan YILMAZ, TÜRKİYE/TURKEY
Dr. Latif Emrah YANMAZ, TÜRKİYE/TURKEY

Ataturk University, Medical Experimental Application and Research Center, Erzurum, TURKEY

Contact: jlasp@atauni.edu.tr, 0 442 344 8762

Lab. Hayv. Bil. & Uyg. Derg., 2022: 02(02)

J. Lab. Anim. Sci. & Pract. 2022: 02(02)

HAKEM VE DANIŞMAN LİSTESİ / LIST OF REFEREES

- Prof. Dr. Adem KARA, Erzurum Teknik Üniversitesi, Fen Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.
 - Prof. Dr. Ali ERTEKİN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Samsun, Türkiye.
 - Prof. Dr. Özgür KAYNAR, Kastamonu Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Kastamonu, Türkiye.
 - Doç. Dr. Cüneyt ÇAĞLAYAN, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Bilecik, Türkiye.
 - Doç. Dr. Kıvanç İRAK, Siirt Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Siirt, Türkiye.
 - Doç. Dr. Suat TEKİN, İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye.
 - Dr. Öğr. Üyesi Burak BİRCAN, Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Osmaniye, Türkiye.
 - Dr. Öğr. Üyesi Nurhan ERKAYA, Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Aksaray, Türkiye.
 - Dr. Recep Hakkı KOCA, Bingöl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Bingöl, Türkiye.
 - Dr. Tutkucan ACISU, Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Elazığ, Türkiye.
- Hakem sıralaması ünvan ve isime göre alfabetik olarak verilmiştir.



**TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**
Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ
JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ

Lab Hayv Bil & Uyg Derg

JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

J Lab Anim Sci & Pract

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALELERİ / RESEARCH ARTICLES	Sayfa Page
Cihan GÜR, Fatih Mehmet KANDEMİR. Oksaliptatin ve Naringin'in Dalak Dokusu Üzerine Etkilerinin Rat Modelinde Değerlendirilmesi. Evaluation of The Effects of Oxaliptatin and Naringin on Spleen Tissue in a Rat Model.	72-80
Mustafa Can GÜLER, Ayhan TANYELİ, Ersen ERASLAN, Selim ÇOMAKLI, Yasin BAYIR. Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Model in Rats. Sıçanlarda Çekal Ligasyon ve Delme Kaynaklı Sepsis Modeli.	81-89
Betül APAYDIN YILDIRIM. Koenzim Q10 ve Hesperidinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi. The Effect of Coenzyme Q10 and Hesperidin on TAS and TOS Levels in Lower Extremity Ischemia-Reperfusion Injury in Rats.	90-95
DERLEMELER / REVIEWS	
Semin Gedikli, Ali Can Özcan. Farelere Uygulanan Deneysel Tip 1 Diyabet Modelleri. Experimental Models of Type 1 Diabetes Administered to Mice.	96-104
Ali Doğan ÖMÜR, Serkan Ali AKARSU. Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması. Semen Collection, Processing and Storage in Rabbits.	105-110



Oksaliplatin ve Naringin'in Dalak Dokusu Üzerine Etkilerinin Rat Modelinde Değerlendirilmesi

Cihan GÜR^{1a✉}, Fatih Mehmet KANDEMİR^{2a}

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE
2. Aksaray Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Aksaray, TÜRKİYE

ORCID: 0000-0001-6775-7858^{1a}, 0000-0002-8490-2479^{2a}

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
30.05.2022	04.07.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Gur C, Kandemir FM: Oksaliplatin ve Naringin'in Dalak Dokusu Üzerine Etkilerinin Rat Modelinde Değerlendirilmesi. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 72-80, 2022.

Öz: Oksaliplatin (OPL), kolorektal kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan platin bazlı kemoterapötik ajandır. Naringin (NRG) ise çeşitli biyolojik ve farmakolojik özelliklere sahip olan antioksidan bir bileşiktir. Sunulan çalışmada OPL ve NRG uygulamalarının ratların dalak dokusu üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde oral olarak 50 veya 100 mg/kg vücut ağırlığı NRG verildikten 30 dakika sonra 4 mg/kg vücut ağırlığı OPL periton içine enjekte edildi. Daha sonra dalak dokusunda malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyeleri ile nükleer faktör-eritroid faktör 2-ilişkili faktör 2 (Nrf2), hem oksijenaz-1 (HO-1), nükleer faktör kappa B (NF-κB), tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α), B hücreli lenfoma 2-ilişkili X proteini (Bax) ve Kaspaz-3 mRNA transkript seviyeleri analiz edilmiştir. Elde edilen veriler OPL tedavisi sonrası artan MDA seviyelerini NRG'nin azalttığını göstermiştir. Ayrıca OPL uygulaması ile azalan GSH, Nrf2 ve HO-1 seviyelerinin NRG tedavisi sonrası artış gösterdiği belirlendi. Ayrıca OPL ile tetiklenen NF-κB, TNF-α, Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarının NRG tarafından aşağı yönlü düzenlendiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, OPL'nin dalak dokusunda oksidatif stres, enflamasyon ve apoptozu tetiklediği buna karşın NRG'nin OPL ile tetiklenen bu olayları tersine çevirdiği sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Apoptoz, Dalak, Naringin, Oksaliplatin, Oksidatif Stres.

Evaluation of The Effects of Oxaliplatin and Naringin on Spleen Tissue in a Rat Model

Abstract: Oxaliplatin (OPL) is a platinum-based chemotherapeutic agent widely used in the treatment of colorectal cancer. Naringin (NRG) is an antioxidant compound with various biological and pharmacological properties. In the present study, the effects of OPL and NRG administrations on spleen tissue of rats were evaluated. On the 1st and 2nd days of the study and on the 5th and 6th days of the study, 30 minutes after oral administration of 50 or 100 mg/kg body weight NRG, 4 mg/kg body weight OPL was injected intraperitoneally. Then, malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels and nuclear factor-erythroid factor 2-related factor-2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor kappa-B (NF-κB), tumor necrosis factor-alpha (TNF-α), B-cell lymphoma 2-associated X protein (Bax), and Caspase-3 mRNA transcript levels were analyzed in spleen tissue. The data obtained showed that NRG reduced the increased MDA levels after OPL treatment. It was also determined that GSH, Nrf2 and HO-1 levels, which decreased with OPL administration, increased after NRG treatment. Moreover, OPL-induced NF-κB, TNF-α, Bax and Caspase-3 expressions were downregulated by NRG. Taken together, it was concluded that OPL triggered oxidative stress, inflammation and apoptosis in spleen tissue whereas NRG reversed these OPL-induced events.

Keywords: Apoptosis, Naringin, Oxaliplatin, Oxidative Stress, Spleen.

✉ Cihan GÜR

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: cihan.gur@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Oksaliplatin (OPL), kolorektal kanserin neoadjuvan ve adjuvan tedavisi için yaygın olarak lökovorin ve florourasil (FOLFOX) ile birlikte uygulanan 3. nesil platin bazlı bir kemoterapötik ajandır (Lees ve ark., 2020). OPL'nin yapısında bulunan taşıyıcı ligand, DNA sentezinin etkili bir şekilde engellenmesini sağlamakta ve böylece oldukça sitotoksik olan DNA eklentileri oluşturmaktadır (Celik ve ark., 2020). Öte yandan bu platin bazlı bileşiğin ciddi yan etkilere sahip olduğu bilinmektedir. OPL'nin en sık görülen ve hastaların yaşam kalitesini önemli derecede etkileyen olayı nörotoksisitedir. Bu etki ilacın doz sınırlamasına da neden olan periferik nöropati olarak kendini gösterir (el Chediak ve ark., 2018). OPL ayrıca artan inflamatuvar aktivite ile hepatik hasar gelişimine de neden olmaktadır (Schwingel ve ark., 2014). OPL bazlı neoadjuvan kemoterapi rejimlerini izleyen klinik ve patolojik analizler, hepatik sinüzoidal yaralanma, portal hipertansiyon, splenomegali ve trombositopenidir. Birkaç çalışma, dalak boyutundaki artışın derecesinin trombosit sayısındaki azalma ile güçlü bir şekilde ilişkili olduğunu vurgulamıştır. Bu nedenle, dalak sekestrasyonu, OPL ile indüklenen trombositopeninin önerilen mekanizmalarından biridir (el Chediak ve ark., 2018).

Artan çalışmalar OPL'nin hem sinir sistemi hem de diğer dokularda reaktif oksijen türlerini arttırarak oksidatif strese neden olduğunu ve bunun OPL'nin toksisite mekanizmasının temelini oluşturabileceği vurgulanmıştır (Celik ve ark., 2020; Lu ve ark., 2020). Bu nedenle OPL kaynaklı toksisiteye karşı doğal olarak meydana gelen antioksidan bileşiklerin faydalı olabileceği düşünülmüştür.

Naringin (NRG) (4',5,7-trihidroksiflavanon 7-rhamnoglucoside), greyfurt ve çeşitli narenciye bitkilerinin önemli bir antioksidanı ve aktif flavanon glikozitidir (Kandemir ve ark., 2017). NRG oral yoldan verildiğinde β -glukosidaz ve α -ramnosidaz gibi enzimler tarafından hidrolize edilerek bileşiğin ana metaboliti ve emilebilir formu olan naringenin elde edilir (Caglayan ve ark., 2018). Hidrolizden sonra

naringenin karaciğer tarafından hızla glukuronid ara ürünlerine metabolize edilir (Alam ve ark., 2014). NRG'nin antiülser, antioksidan, anti-inflamatuvar, antiapoptotik ve antihiperlipidemik etkileri olduğu bildirilmiştir (Kandemir ve ark., 2017).

Sunulan çalışmada OPL'nin ratların dalak dokusunda oksidatif stres, inflamatuvar ve apoptotik yolaklar üzerine etkileri ve OPL'nin bu etkilerine karşı NRG'nin koruyucu özellikleri araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Kimyasallar

Oksaliplatin, DEVA Holding A.Ş.'den (İstanbul, Türkiye) oksalpin (100 mg/20 ml enjekte edilebilir solüsyon) halinde satın alınmıştır. NRG ve diğer tüm kimyasallar Sigma Chemical Co'dan temin edilmiştir.

Çalışmada Kullanılan Hayvanlar ve Barındırılma Koşulları

Çalışmada, Atatürk Üniversitesi, Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (Erzurum, Türkiye) temin edilen 35 adet erkek Sprague Dawley ratlar kullanıldı. Ratlar 24 ± 1 °C sıcaklığa, 45 ± 5 neme ve 12 saat karanlık/aydınlık döngüsüne sahip ortamda barındırıldılar ve ad-libitum su ve standart laboratuvar yemi ile beslendiler. Çalışmanın etik kurul izni Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından verildi (Onay No: 2021-3/96).

Deney Grupları

Hayvanlar her grupta 7 adet olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. OPL ve NRG dozları önceki çalışmalar referans alınarak belirlendi (Caglayan ve ark., 2018; Celik ve ark., 2020). Gruplar;

1. Kontrol grubu: Bu ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde periton içine %5'lik glikoz çözeltisi verildi.

2. NRG grubu: Bu ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde oral olarak 100 mg/kg vücut ağırlığı NRG verildi.

3. OPL grubu: OPL %5'lik dextroz çözeltisi içerisinde çözdürüldükten sonra ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde periton içine 4 mg/kg vücut ağırlığı enjekte edildi (toplam kümülatif doz 16 mg / kg / vücut ağırlığı).

4. OPL + NRG 50 Grubu: Bu ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde oral olarak 50 mg/kg vücut ağırlığı NRG verildikten 30 dakika sonra %5'lik dextroz çözeltisi içerisinde 4 mg/kg vücut ağırlığı OPL periton içine enjekte edildi.

5. OPL + NRG 100 Grubu: Bu ratlara çalışmanın 1. ve 2. günleri ile 5. ve 6. günlerinde oral olarak 100 mg/kg vücut ağırlığı NRG verildikten 30 dakika sonra %5'lik dextroz çözeltisi içerisinde 4 mg/kg vücut ağırlığı OPL periton içine enjekte edildi.

Son OPL uygulamasından 24 saat sonra (7. gün) ratlar hafif sevofloran anestezisi altında dekapite edilerek dalak dokuları alındı. Dalak dokuları biyokimyasal ve moleküler analizler yapıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

Dalak Dokusunda Malondialdehit Analizi

Sıvı nitrojen içerisinde toz hale getirilen dalak dokuları %1,15'lik KCl tamponu ile 1:10 (w/v) oranında seyreltilerek homojenizatörde (Tissue Lyser II, Qiagen, Almanya) homojenize edildi. Homojenatlar +4 °C'de 1000 g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra süpernatantlarda malondialdehit (MDA) seviyelerinin analizi için Placer ve ark. (1966)'nın geliştirdiği metot kullanıldı. Sonuçlar nmol/g doku olarak değerlendirildi.

Dalak Dokusunda GSH Analizi

MDA analizlerinde hazırlanışı anlatılan homojenatlar +4 °C'de 9000 g'de 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen süpernatantlar kullanılarak Sedlak ve ark. (1968)'in metodu ile dalak dokusunda glutatyon (GSH) seviyeleri analiz edildi. Sonuçlar nmol/g doku olarak sunuldu.

Dalak Dokusunda RT-PCR Analizleri

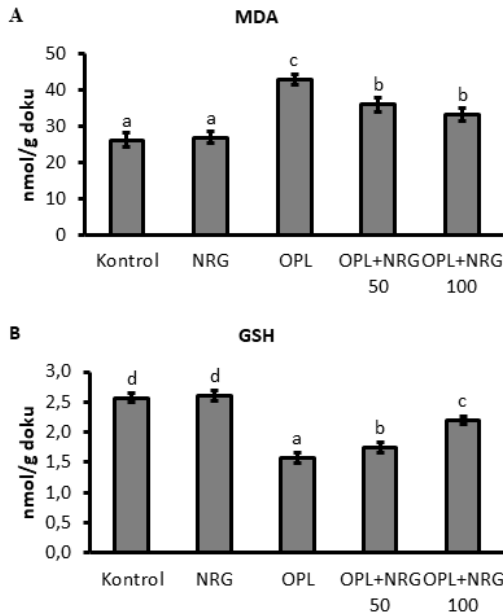
Toz hale getirilen dalak dokularından hibrizol (HibriGen) reaktifi kullanılarak ve üreticinin talimatları uygulanarak total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Total RNA'ların konsantrasyonları NanoDrop (Epoch Microplate Spectrofotometer, ABD) cihazı kullanılarak ölçüldü. Daha sonra total RNA'lardan iScript™ cDNA Synthesis Kit'i (BIO-RAD, ABD) kullanılarak cDNA'lar elde edildi. Son aşamada ise elde edilen cDNA'lar, nükleer faktör-eritroid faktör 2-ilişkili faktör 2 (Nrf-2) (F: TTTGTAGATGACCATGAGTCGC, R: TCCTGCCAACTTGCTCCAT), hem oksijenaz-1 (HO-1) (F: ATGTCCCAGGATTTGTCCGA, R: ATGGTACAAGGAGGCCATCA), nükleer faktör kappa B (NF-κB) (F: AGTCCCGCCCTTCTAAAAC, R: CAATGGCCTCTGTGTAGCCC), tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) (F: CTCGAGTGACAAGCCCGTAG, R: ATCTGCTGGTACCACCAGTT), B hücreli lenfoma 2-ilişkili X proteini (Bax) (F: TTTTCATCCAGGATCGAGCAG, R: AATCATCCTCTGCAGCTCCA) ve Kazpaz-3 (F: ACTGGAATGTCAGCTCGCAA, R: GCAGTAGTCGCTCTGAAGA) primerleri ve iTaQ Universal SYBR Green Supermix (BIORAD, ABD) ile mix hazırlandıktan sonra ROTOR-GENE Q (Qiagen, Almanya) cihazında mRNA transcript seviyeleri analiz edildi. Analizlerde internal kontrol olarak β-aktin (F: CAGCCTTCTTGGGTATG, R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT) kullanıldı. Her bir örnek üç tekrarlı olarak çalışıldı ve ekspresyon seviyeleri Livak ve ark. (2001) tarafından geliştirilen 2-ΔΔCT metodu ile hesaplandı.

İstatistiksel Analizler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS 20.0 paket programı kullanılarak yapıldı. Tüm gruplara ait veriler ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunuldu. Verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendikten sonra gruplar arası farklılıkların tespiti için tek yönlü ANOVA ve Tukey's post hoc testleri kullanıldı.

BULGULAR**OPL ve NRG Verilen Ratların Dalak Dokularında MDA ve GSH Seviyeleri**

Ratlara OPL ve NRG uygulaması sonrası dalak dokularından elde edilen MDA ve GSH seviyeleri Şekil 1'de sunulmuştur. Buna göre OPL tedavisinin dalak dokusunda MDA seviyelerini kontrol grubuna göre önemli derecede arttırdığı belirlendi ($p<0.05$). Öte yandan NRG verilen ratların dalak dokularında MDA seviyelerinin OPL grubuna göre azaldığı ($p<0.05$) fakat gruplar arası anlamlı bir farkın oluşmadığı görüldü. Elde edilen veriler ayrıca OPL'nin dalak dokusunda GSH depolarını da tükettiğini göstermektedir. OPL'ye karşı uygulanan NRG'nin ise antioksidan özellik göstererek GSH depolarını yenilediği tespit edildi. Ayrıca 100 mg/kg uygulanan NRG'nin 50 mg/kg verilen doza göre daha etkili olduğu da elde edilen veriler arasındadır ($p<0.05$).



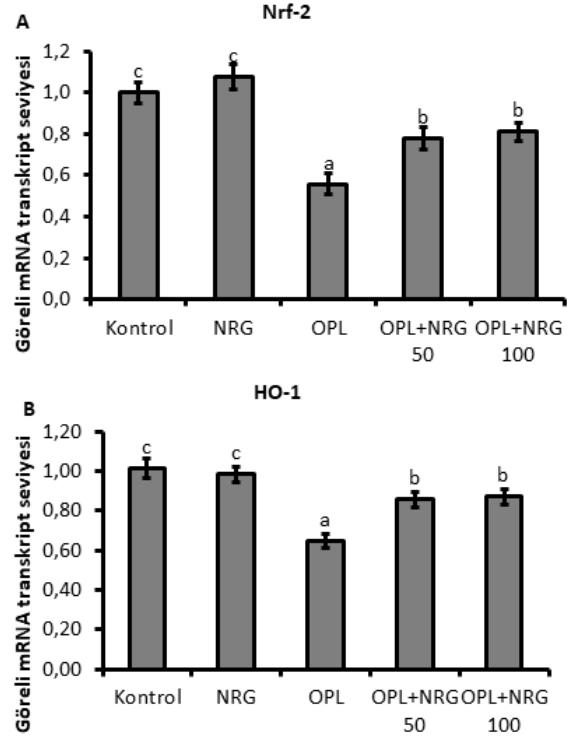
Şekil 1: Oksaliplatin ve naringin tedavilerinden sonra dalak dokusunda MDA ve GSH seviyeleri. OPL: Oksaliplatin, NRG: Naringin, MDA: Malondialdehit, GSH: glutasyon. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

Figure 1: MDA and GSH levels in spleen tissue after oxaliplatin and naringin treatments. OPL: Oxaliplatin, NRG: Naringin, MDA: Malondialdehyde, GSH:

glutathione. The letters on the columns show the statistical differences between the groups ($p<0.05$).

OPL ve NRG Verilen Ratların Dalak Dokularında Nrf-2 ve HO-1 mRNA Transkript Seviyeleri

Dalak dokusuna ait Nrf-2 ve HO-1 mRNA transkript seviyeleri Şekil 2'de özetlenmiştir. RT-PCR metodu ile alınan sonuçlar OPL'nin hem Nrf-2 hem de HO-1 genlerini baskıladığını göstermektedir. Bununla birlikte NRG tedavisinden sonra Nrf-2 ve HO-1 genlerinin aktive olarak OPL grubuna göre mRNA transkript seviyelerinin artış gösterdiği belirlendi ($p<0.05$). NRG'nin dozları arasında ise anlamlı bir farkın olmadığı görüldü.

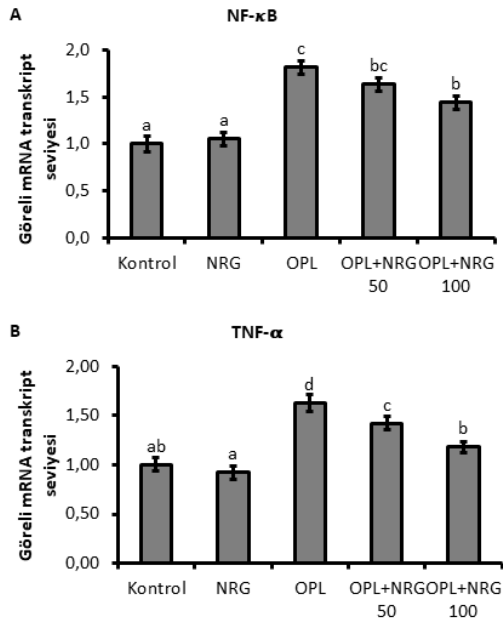


Şekil 2: Oksaliplatin ve naringin tedavilerinden sonra dalak dokusunda Nrf2 ve HO-1 mRNA transkript seviyeleri. OPL: Oksaliplatin, NRG: Naringin, Nrf2: nükleer faktör-eritroid faktör 2-ilişkili faktör 2, HO-1: hem oksijenaz-1. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$).

Figure 2: Nrf2 and HO-1 mRNA transcript levels in spleen tissue after oxaliplatin and naringin treatments. OPL: Oxaliplatin, NRG: Naringin, Nrf2: nuclear factor-erythroid factor 2-related factor-2, HO-1: heme oxygenase-1. The letters on the columns show the statistical differences between the groups ($p<0.05$).

OPL ve NRG Verilen Ratların Dalak Dokularında NF- κ B ve TNF- α mRNA Transkript Seviyeleri

Çalışmada enflamasyonun önemli göstergeleri olan NF- κ B ve TNF- α 'nın mRNA transkript seviyeleri analiz edildi. Şekil 3'te verilen sonuçlara göre OPL'nin NF- κ B ve TNF- α genlerini yukarı yönlü düzenleyerek enflamasyona neden olabileceği belirlendi. NRG ise bu genlerin mRNA transkript seviyelerini OPL grubuna göre önemli derecede azaltmıştır. NF- κ B geni üzerine 50 mg/kg verilen dozun etkili olmadığı, TNF- α üzerine ise yüksek dozun daha etkili olduğu görüldü.

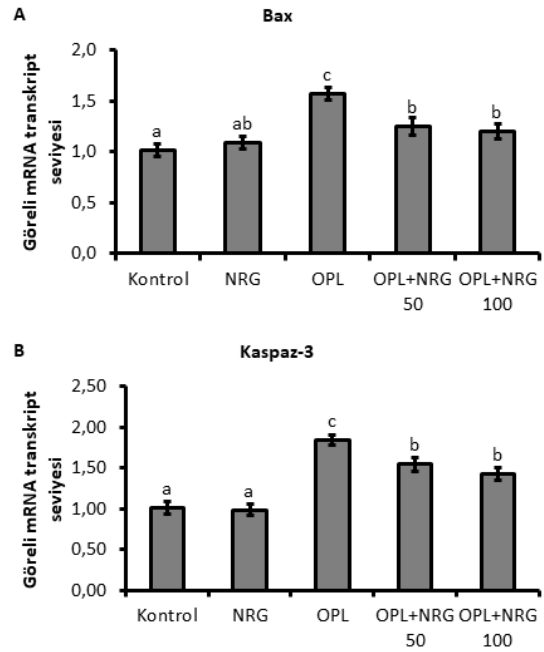


Şekil 3: Oksaliplatin ve naringin tedavilerinden sonra dalak dokusunda NF- κ B ve TNF- α mRNA transkript seviyeleri. OPL: Oksaliplatin, NRG: Naringin, NF- κ B: nükleer faktör kappa B, TNF- α : Tumor necrosis factor-alpha. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir (p<0.05)

Figure 3: NF- κ B and TNF- α mRNA transcript levels in spleen tissue after oxaliplatin and naringin treatments. OPL: Oxaliplatin, NRG: Naringin, NF- κ B: Nuclear factor kappa-B, TNF- α : Tümör nekroz faktörü alfa. The letters on the columns show the statistical differences between the groups (p<0.05)

OPL ve NRG Verilen Ratların Dalak Dokularında Bax ve Kaspaz-3 mRNA Transkript Seviyeleri

Dalak dokusunda apoptotik durumu belirlemek için Bax ve Kaspaz-3 genlerinin mRNA transkript seviyeleri RT-PCR metodu ile analiz edildi. Elde edilen verilere göre OPL dalak dokusunda Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarını yukarı yönlü düzenleyerek apoptoza neden olmuştur (Şekil 4). NRG tedavisi ise bu genlerin ekspresyonlarını baskılayarak anti-apoptotik etki göstermiştir (Şekil 4). Öte yandan NRG'nin dozları arasında anlamlı bir farkın olmadığı da elde edilen bulgularımızdandır (Şekil 4).



Şekil 4: Oksaliplatin ve naringin tedavilerinden sonra dalak dokusunda Bax ve Kaspaz-3 mRNA transkript seviyeleri. OPL: Oksaliplatin, NRG: Naringin, Bax: B hücreli lenfoma 2-ilişkili X proteini. Sütunların üzerinde bulunan harfler gruplar arası istatistiksel farklılıkları göstermektedir (p<0.05)

Figure 4: Bax and Kaspaz-3 mRNA transcript levels in spleen tissue after oxaliplatin and naringin treatments. OPL: Oxaliplatin, NRG: Naringin, Bax: B-cell lymphoma 2-associated X protein. The letters on the columns show the statistical differences between the groups (p<0.05)

TARTIŞMA ve SONUÇ

OPL kolorektal kanser tedavisinde 5FU, lökovorin, kapesitabin ve/veya irinotekan ile kombine olarak yaygın bir şekilde kullanılan ve progresyonsuz sağkalım ve yanıt oranları açısından

önemli klinik fayda sağlayan kemoterapi rejimidir (Adam ve ark., 2010; de Gramont ve ark., 2000; Yehia ve ark., 2019). Bununla birlikte, OPL tedavisi periferik nöropatinin yanı sıra çeşitli dokularda toksisiteye neden olmaktadır. OPL'nin toksisite mekanizmasının temelinde ise oksidatif stresin yer aldığı öngörülmektedir (di Cesare Mannelli ve ark., 2013; Tabassum ve ark., 2015).

OPL, hem nükleer DNA hem de mitokondriyal DNA (mtDNA) dahil olmak üzere DNA hasarına neden olan in-vivo hidrata metabolize edilir (Graham ve ark., 2000). Araştırmalar, mtDNA'nın daha savunmasız olduğunu göstermektedir, bu da mitokondriyal membranın lipid peroksidasyonunu ve mitokondrinin depolarizasyonunu ilişkilendirmektedir. Tüm bu etkiler, hücre ölüm yolunun indüklenmesi, reaktif oksijen türlerinin keskin bir şekilde artırılması ve serbest bırakılması, oksidatif stresin bariz aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Membran lipidleri, lipid peroksidasyonuna yol açan ROS'a duyarlıdır. MDA, çoklu doymamış yağ asitlerinin lipid peroksidasyonundan türetilir ve lipid peroksidasyon seviyesini ölçmek için bir biyobelirteçtir (Xia ve ark., 2019). GSH oksidatif metabolizma sonucu meydana gelen serbest radikalleri bağlayarak okside forma (GSSG) dönüşmekte ve vücudu oksidatif hasardan korumaktadır. ROS'ların aşırı üretimi antioksidan kapasitenin aşılmasına ve sonuç olarak oksidatif strese neden olmaktadır (Gur ve ark., 2021). Önceki bir çalışmada OPL'nin karaciğerde oksidatif gösterge olan MDA seviyelerini arttırdığı, antioksidan enzimler olan SOD, CAT ve GSH seviyelerini ise önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca aynı çalışma doğal bir antioksidan olan kurkumin tedavisinden sonra OPL ile indüklenen MDA düzeylerinin azaldığı ve SOD, CAT ve GSH düzeylerinin arttığı rapor edilmiştir (Lu ve ark., 2020). Sunulan çalışmada da benzer olarak OPL'nin muhtemelen reaktif oksijen türlerini arttırarak GSH depolarını tükettiği ve lipid peroksidasyonuna neden olarak MDA seviyelerini arttırdığı görüldü. Bununla birlikte NRG'nin antioksidan özelliğine bağlı olarak

ROS'ların süpürüldüğü, GSH depolarının yenilendiği ve lipid peroksidasyonunun azaldığı tespit edildi.

Nrf2, temel lösin fermuar transkripsiyon faktörleri (NF-E2) aile üyelerinden biridir. Artan ROS'lar Nrf2'yi tetiklemekte ve Nrf2 de SOD, CAT ve HO-1 gibi antioksidan enzimlerin kodlanmasını sağlamaktadır. Oksidatif stresin belirli seviyelerinde bu genin ekspresyonu yukarı yönlü düzenlenirken, aşırı veya uzun süre devam etmesi halinde aşağı yönlü regüle edilmektedir (Gur ve ark., 2021). Sunulan çalışmada OPL'nin dalak dokusunda Nrf2 geni ile bağlantılı olarak HO-1 ekspresyonunu aşağı yönlü düzenlediği bununla birlikte NRG tedavisinden sonra bu genlerin mRNA transkript seviyelerinin önemli derecede artış gösterdiği belirlendi. Benzer olarak önceki bir çalışmada OPL uygulamasının Nrf2 seviyelerinde kontrol grubuna göre azalma meydana getirdiği bildirilmiştir (Areti ve ark., 2018).

NF-κB, TNF-α, IL-1β ve IL-6 gibi pro-enflamatuar sitokinlerin ve enflamatuar yanıtta rol aldığı bilinen COX-2'nin transkripsiyonunu arttırarak enflamasyon sürecine önemli katkılar sunan bir nükleer transkripsiyon faktörüdür (Gur ve ark., 2021; İleriturk ve ark., 2021). Önceki çalışmalarda OPL'nin pro-enflamatuar sitokin seviyelerini arttırarak enflamasyona neden olduğu bildirilmiştir (Recalde ve ark., 2020; Wang ve ark., 2017). Sunulan çalışmada da benzer olarak OPL uygulaması ile dalak dokusunda NF-κB ekspresyonunun yukarı yönlü düzenlendiği ve muhtemelen buna bağlı olarak TNF-α ekspresyonunun tetiklendiği belirlendi. Oksidatif stres ve enflamasyon arasındaki ilişki göz önüne alındığında (Kucukler ve ark., 2021) NRG'nin oksidatif stresi baskılaması ve dolayısıyla NF-κB yolağının kesintiye uğramasıyla NRG'nin dalakta OPL kaynaklı enflamasyonu engelleyebileceği görüldü.

Apoptoz normal bir hücre ölüm sürecidir (Gür ve ark., 2022; Semis ve ark., 2022; Gür ve ark., 2022). Ancak kontrolsüz bir şekilde meydana geldiğinde dokuların işlevlerinin yitirilmesine neden olmaktadır (Yıldız ve ark., 2022). Kaspaz enzimi ile Bax proteini apoptotik yolda önemli görevler üstlenmektedir ve apoptotik durumun belirlenmesinde yaygın olarak

kullanılan biyobelirteçlerdir (Kandemir ve ark., 2022; Yesildag ve ark., 2022). Çalışmamızda OPL uygulaması ile artan Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonları belirlenmiştir. Öte yandan çalışmamızda NRG'nin Bax ve Kaspaz-3 ekspresyonlarını baskılayarak apoptozu hafifletebileceği tespit edilmiştir. Benzer olarak önceki bir çalışmada da OPL tedavisinin azalttığı kaspaz-3 ekspresyonunun resveratrol, rutin, kuersetin ve kuersetin nanoemülsiyonu uygulamasından sonra belirgin şekilde arttığı bildirilmiştir (Schwingel ve ark., 2014).

Sonuç olarak çalışmada OPL'nin dalak dokusunda oksidatif stresi, enflamasyonu ve apoptozu tetikleyerek doku hasarına neden olabileceği bununla birlikte NRG tedavisinin OPL kaynaklı hasarı oksidatif stres, enflamasyon ve apoptozun engellenmesi yoluyla hafifletebileceği belirlenmiştir.

Çıkar Çatışması

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Adam R., Haller DG., Poston G., Raoul JL., Spano JP., Taberero J., Van Cutsem E., 2010. Toward optimized front-line therapeutic strategies in patients with metastatic colorectal cancer an expert review from the International Congress on Anti-Cancer Treatment (ICACT) 2009. *Annals of Oncology*, 21, 1579-1584.
- Alam MA., Subhan N., Rahman MM., Uddin SJ., Reza HM., Sarker, SD., 2014. Effect of citrus flavonoids, naringin and naringenin, on metabolic syndrome and their mechanisms of action. *Advances in Nutrition*, 5, 404-417.
- Areti A., Komirishetty P., Kalvala AK., Nellaiappan K., Kumar, A., 2018. Rosmarinic Acid Mitigates Mitochondrial Dysfunction and Spinal Glial Activation in Oxaliplatin-induced Peripheral Neuropathy. *Molecular Neurobiology*, 55, 7463–7475.
- Caglayan C., Temel Y., Kandemir FM., Yildirim S., Kucukler S., 2018. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 20968-20984.
- Celik H., Kucukler S., Ozdemir S., Comakli S., Gur C., Kandemir FM., Yardim A., 2020. Lycopene protects against central and peripheral neuropathy by inhibiting oxaliplatin-induced ATF-6 pathway, apoptosis, inflammation and oxidative stress in brains and sciatic tissues of rats. *Neurotoxicology*, 80, 29-40.
- de Gramont A., Figer A., Seymour M., Homerin M., Hmissi A., Cassidy J., Boni C., Cortes-Funes H., Cervantes A., Freyer G., Papamichael D., le Bail N., Louvet C., Hendler D., de Braud F., Wilson C., Morvan F., Bonetti A., 2000. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 18, 2938–2947.
- di Cesare Mannelli L., Zanardelli M., Failli P., Ghelardini C., 2013. Oxaliplatin-induced oxidative stress in nervous system-derived cellular models: Could it correlate with in vivo neuropathy? *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 143–150.
- El Chediak A., Haydar A.A., Hakim A., Abdel Massih S., Hilal L., Mukherji D., Temraz S., Shamseddine A., 2018. Increase in spleen volume as a predictor of oxaliplatin toxicity. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 14, 653.
- Graham MA., Lockwood GF., Greenslade D., Brienza S., Bayssas M., Gamelin, E., 2000. Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review. *Clinical Cancer Research*, 6, 1205-1218.
- Gur C., Kandemir O., Kandemir FM., 2022a. Investigation of the effects of hesperidin administration on abamectin-induced testicular toxicity in rats through oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and JAK2/STAT3 pathways. *Environmental Toxicology*, 37, 401-

- 412.
11. Gur C., Kandemir FM., Darendelioglu E., Caglayan C., Kucukler S., Kandemir O., Ileriturk M., 2021. Morin protects against acrylamide-induced neurotoxicity in rats: an investigation into different signal pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 49808-49819.
 12. Gür C., Genç A., Kandemir Ö., 2022. Ratlarda Deltametrin'in Neden Olduğu Dalak Toksisitesine Karşı Rutin'in Potansiyel Koruyucu Etkilerinin Oksidatif Stres, Apoptoz ve İnflamasyon Belirteçleri Üzerinden Araştırılması. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 17, 6-10.
 13. Gür C., Kandemir Ö., Kandemir FM., 2022. Ratlarda diklofenak ile indüklenen kardiyotoksikite üzerine krisinin etkilerinin oksidatif stres, endoplazmik retikulum stresi ve apoptoz belirteçleri ile değerlendirilmesi. *Kocatepe Veterinary Journal*, 15, 151-160.
 14. Ileriturk M., Benzer F., Aksu EH., Yildirim S., Kandemir FM., Dogan T., Dortbudak MB., Genc A., 2021. Chrysin protects against testicular toxicity caused by lead acetate in rats with its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties. *Journal of Food Biochemistry*, 45, p.e13593.
 15. Kucukler S., Benzer F., Yildirim S., Gur C., Kandemir FM., Bengu AS., Ayna A., Caglayan C., Dortbudak, MB., 2021. Protective effects of chrysin against oxidative stress and inflammation induced by lead acetate in rat kidneys: a biochemical and histopathological approach. *Biological Trace Element Research*, 199, 1501-1514.
 16. Lees JG., White D., Keating BA., Barkl-Luke ME., Makker PG., Goldstein D., Moalem-Taylor G., 2020. Oxaliplatin-induced haematological toxicity and splenomegaly in mice. *Plos one*, 15, p.e0238164.
 17. Livak KJ., Schmittgen TD., 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25, 402-408.
 18. Lu Y., Wu S., Xiang B., Li L., Lin Y., 2020. Curcumin Attenuates Oxaliplatin-Induced Liver Injury and Oxidative Stress by Activating the Nrf2 Pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 14, 73.
 19. Kandemir FM., Ileriturk M., Gur C., 2022. Rutin protects rat liver and kidney from sodium valproate-induced damage by attenuating oxidative stress, ER stress, inflammation, apoptosis and autophagy. *Molecular Biology Reports*, 1-12.
 20. Kandemir FM., Kucukler S., Caglayan C., Gur C., Batil AA., Gülçin İ., 2017. Therapeutic effects of silymarin and naringin on methotrexate-induced nephrotoxicity in rats: Biochemical evaluation of anti-inflammatory, antiapoptotic, and anti-autophagic properties. *Journal of food biochemistry*, 41, p.e12398.
 21. Placer ZA., Cushman LL., Johnson BC., 1966. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Analytical biochemistry*, 16, 359-364.
 22. Recalde MD., Miguel CA., Noya-Riobó MV., Gonzalez SL., Villar MJ., Coronel MF., 2020. Resveratrol exerts anti-oxidant and anti-inflammatory actions and prevents oxaliplatin-induced mechanical and thermal allodynia. *Brain Research*, 1748, p.147079.
 23. Schwingel TE., Klein CP., Nicoletti NF., Dora CL., Hadrich G., Bica CG., Lopes TG., da Silva VD., Morrone FB., 2014. Effects of the compounds resveratrol, rutin, quercetin, and quercetin nanoemulsion on oxaliplatin-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387, 837-848.
 24. Sedlak J., Lindsay RH., 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical biochemistry*, 25, 192-205.
 25. Semis HS., Gur C., Ileriturk M., Kandemir FM., Kaynar O., 2022. Evaluation of Therapeutic

- Effects of Quercetin Against Achilles Tendinopathy in Rats via Oxidative Stress, Inflammation, Apoptosis, Autophagy, and Metalloproteinases. *American Journal of Sports Medicine*, 50, 486–498.
26. Tabassum H., Waseem M., Parvez S., Qureshi M., 2015. Oxaliplatin-induced Oxidative Stress Provokes Toxicity in Isolated Rat Liver Mitochondria. *Archives of Medical Research*, 46, 597–603.
27. Wang YS., Li YY., Cui W., Li LB., Zhang ZC., Tian BP., Zhang GS., 2017. Melatonin attenuates pain hypersensitivity and decreases astrocyte-mediated spinal neuroinflammation in a rat model of oxaliplatin-induced pain. *Inflammation*, 40, 2052-2061.
28. Xia T., Zhang J., Han L., Jin Z., Wang J., Li X., Man S., Liu C., Gao W., 2019. Protective effect of magnolol on oxaliplatin-induced intestinal injury in mice. *Phytotherapy Research*, 33, 1161-1172.
29. Yehia R., Saleh S., El Abhar H., Saad AS., Schaalán, M., 2019. L-Carnosine protects against Oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in colorectal cancer patients: A perspective on targeting Nrf-2 and NF- κ B pathways. *Toxicology and applied pharmacology*, 365, 41-50.
30. Yesildag K., Gur C., Ileriturk M., Kandemir FM., 2022. Evaluation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, oxidative DNA damage and metalloproteinases in the lungs of rats treated with cadmium and carvacrol. *Molecular Biology Reports*, 49, 1201–1211.
31. Yıldız MO., Çelik H., Caglayan C., Kandemir FM., Gür C., Bayav İ., Genç A., Kandemir, Ö., 2022. Neuromodulatory effects of hesperidin against sodium fluoride-induced neurotoxicity in rats: Involvement of neuroinflammation, endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy. *NeuroToxicology*, 90, 197-204.



TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY
LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ
JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Model in Rats

Mustafa Can GÜLER^{1a}, Ayhan TANYELİ^{1b}, Ersen ERASLAN^{2a}, Selim ÇOMAKLI^{3a}, Yasin BAYIR^{4a}

1. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, TURKEY.
2. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Yozgat Bozok University, Yozgat, TURKEY.
3. Department of Pathology, Faculty of Veterinary, Atatürk University, Erzurum, TURKEY.
4. Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Atatürk University, Erzurum, TURKEY.

ORCID: 0000-0001-8588-1035^{1a}, 0000-0002-0095-0917^{1b}, 0000-0003-2424-2269^{2a}, 0000-0002-8744-7686^{3a}, 0000-0003-3562-6727^{4a}

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
02.06.2022	07.07.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Guler MC, Tanyeli A, Eraslan E, Comakli S, Bayir Y: Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Model in Rats. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 81-89, 2022.

Abstract: Sepsis is a worldwide health problem with a high mortality rate. It may result from various conditions, including trauma, surgery, and infection. Kidneys and lungs rank among the sepsis-induced injured organs. Cecal ligation and puncture (CLP) is similar to clinical sepsis and is preferred to imitate clinical diverticulitis or appendicitis perforations. Here, we designed a CLP model as a prestudy for further protective agent studies against CLP-induced sepsis. We aimed to find biochemical and histological results compatible with previous experimental CLP models in the literature. We used 20 female Wistar Albino rats. We created two randomized groups, a sham group, and a CLP group (n=10). We measured interleukin 1-beta (IL-1 β), IL-6, and IL-10 cytokine levels. We assessed myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) levels in renal and lung tissues. We also examined the tissue samples for histopathological and immunohistochemical evaluation. Cytokine levels and oxidant parameters were increased, and antioxidant parameters decreased in the CLP group as an indicator of a strong immune response due to sepsis. Histopathological and immunohistochemical findings supported the biochemical findings on behalf of sepsis. The results demonstrated a meaningful sepsis picture indicating a successful CLP model, which we may prefer to use in further CLP-induced sepsis models.

Keywords: Cecal ligation and Puncture, Rat, Sepsis.

Sıçanlarda Çekal Ligasyon ve Delme Kaynaklı Sepsis Modeli

Öz: Sepsis, yüksek ölüm oranına sahip dünya çapında bir sağlık sorunudur. Travma, cerrahi ve enfeksiyon gibi çeşitli durumlardan kaynaklanabilir. Böbrek ve akciğerler sepsise bağlı hasarlanan organlar arasında yer alır. Çekal ligasyon ve delme (CLP) klinik sepsise benzerdir. Klinik divertikülit veya apandisit perforasyonlarını taklit etmek için tercih edilir. Bu çalışmayı, ileride gerçekleştirmeyi planladığımız CLP ile indüklenen sepsise karşı koruyucu ajan çalışmalarını için bir ön çalışma olarak tasarladık. Literatürde bulunan deneysel CLP modelleriyle uyumlu biyokimyasal ve histolojik sonuçları bulmayı hedefledik. Çalışmada 20 adet dişi Wistar Albino sıçan kullandık. Rastgele iki grup oluşturduk; sham grubu ve CLP grubu (n=10). İnterlökin 1-beta (IL-1 β), IL-6 ve IL-10 sitokin seviyelerini ölçtük. Böbrek ve akciğer dokularında miyeloperoksidaz (MPO), süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeylerini belirledik. Ayrıca doku örneklerini histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme için inceledik. CLP grubunda sepsise bağlı güçlü bir immün yanıtın göstergesi olarak sitokin seviyeleri ve oksidan parametreleri artarken antioksidan parametreler azaldı. Ayrıca, histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular biyokimyasal bulguları sepsis lehine destekledi. Elde ettiğimiz sonuçlar ileride CLP ile indüklenen sepsis modeli olarak kullanabileceğimiz başarılı bir CLP modelini gösteren anlamlı bir sepsis tablosu oluşturdu.

Anahtar Kelimeler: Çekal ligasyon ve Delme, Sepsis, Sıçan.

✉ Mustafa Can GÜLER

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Atatürk University, Erzurum, TURKEY.
e-posta: mcanguler@yahoo.com

INTRODUCTION

Sepsis is a serious health condition with a high mortality rate (Dellinger et al., 2013). It influences more than 19 million people worldwide annually (Prescott & Angus, 2018). Major surgery, burns, shock, and many health conditions may lead to sepsis (Rhodes et al., 2017). Sepsis is an infection-related systematic inflammatory disease (Cheng et al., 2017). There is a host response failure (Benz et al., 2016) and a dysfunctional inflammatory host reaction (Cecconi et al., 2018) against infections. Severe inflammation leads to multiple organ dysfunctions (Seymour et al., 2016). Kidneys and lungs rank among the sepsis-induced injured organs (Lan et al., 2017). Certain animal studies have examined sepsis-induced acute lung injury (ALI) (Sadowitz et al., 2011; Xiao et al., 2014). ALI occurs in various severe sepsis cases (Zimmerman et al., 2009). Sepsis-induced lung injury plays a role in inflammatory cascade via neutrophil activation (Park et al., 2019).

High neutrophil levels enhance reactive oxygen species (ROS) production which causes oxidative stress injury (Bi et al., 2017). Oxidative stress leads to malondialdehyde (MDA) generation (Till et al., 1985). MDA levels raise in cecal ligation and puncture (CLP)-induced septic lung tissues (Y. Wang et al., 2018). Neutrophils secrete myeloperoxidase (MPO) (Srivastava et al., 2010) that is used to assess the neutrophil accumulation in inflamed tissues (Lingaraju et al., 2015). Superoxide dismutase (SOD) is a primary defense preventing oxidative stress. CLP elevated hepatic MPO activity and decreased hepatic SOD activity in a previous study (Makled et al., 2016). Glutathione (GSH) plays a key role in oxidative stress (Dröge, 2002). Oxidative damage decreases GSH levels (Seibt et al., 2019).

High proinflammatory cytokine levels increase the mortality rate during sepsis (Mikkelsen et al., 2013). Bacterial toxins initiate several pro-inflammatory cytokine productions such as interleukin 1 (IL-1) and IL-6 which are vital for sepsis (Galanos & Freudenberg, 1993). Sepsis-induced ALI

elevates pro-inflammatory cytokines, particularly IL-1 β and IL-6 levels (Polat et al., 2013). In addition to the pro-inflammatory response, anti-inflammatory mechanisms also occur during sepsis (Potjo et al., 2019). IL-10 levels were correlated with IL-6 levels in a previous CLP model (Zhang et al., 2021).

Various sepsis models, including CLP have been examined for more than 30 years on animals (Schabbaauer, 2012). CLP is a similar model to clinical sepsis and is preferred to imitate clinical diverticulitis or appendicitis perforations (Bastarache & Matthay, 2013; Song et al., 2013). Here, we designed a CLP model as a prestudy for further protective agent studies against CLP-induced sepsis. We aimed to find biochemical and histological results compatible with previous experimental CLP models in the literature. Thus, we hope to create more comprehensive and multidisciplinary CLP model research via experiencing CLP model creation.

MATERIALS and METHODS

Ethical Approval and Experimental Animals

Atatürk University Experimental Animal Ethics Committee confirmed the experiment (11.06.2020-95). Atatürk University Experimental Animal Research and Application Center procured the experimental animals and surgical room for the experimental procedure. We used 20 female Wistar Albino rats (200 gr-250 gr). We housed the animals under laboratory conditions at 22-25°C with a 12-/12-h light/dark cycle. We granted food and water access ad libitum.

Chemicals, Experimental Groups, and CLP Model

We anesthetized and immobilized the rats in the horizontal position. Then, we shaved and disinfected the abdominal regions. We used 15 mg/kg intraperitoneal (i.p.) xylazine hydrochloride (Rompun[®], Bayer, Istanbul), 100 mg/kg i.p. ketamine (Ketalar[®], Pfizer, Istanbul) for anesthesia (Bayraktutan et al., 2021), and 10% povidone-iodine solution (Batticon; Adeka,) for disinfection. We

created two randomized groups, a sham group, and a CLP group.

Sham group (n=10): We incised longitudinally at 2-2.5 cm, along the ventral line below the xiphoid. We only opened the abdominal cavities of the animals and closed back.

CLP group (n=10) = We established a CLP model modified from previous studies (Daniel Rittirsch et al., 2009; Linlin Song et al., 2018). Following the abdominal incision, we reached the ventral cavity. We identified and exteriorized the cecum. We dissected the mesentery of the cecum carefully avoiding an injury in the cecal branch of the ileocecal artery.

In addition to sepsis duration and needle size, cecum ligation length also determines the severity of the CLP model (Ruiz et al., 2016). We performed a medium ligation to induce a mid-grade sepsis. The distance between the distal pole and ligation, and the distance from the ligation to the basis of the cecum were nearly the same. We ligated distal cecum lower than the ileocecal valve level to prevent intestinal obstruction.

We punctured the cecum using an 18-gauge needle to take a single pass through the cecum. We removed the needle and extruded a small amount of fetal content to make sure of the holes. We replaced the cecum into the abdominal cavity and closed the incision with 3.0 silk suture. We injected normal saline (0.9% NaCl, 50 mL/1 kg, 37°C) subcutaneously as postoperative fluid resuscitation. We put back the rats in the cages following the experimental process. The animals were free to access food and water.

A mid-grade CLP-induced sepsis model (18-gauge needle, medium ligation) occurs at approximately 16 hours (Hubbard et al., 2005). Thereby, after 16 hours, we sacrificed the rats under high-dose anesthesia. We collected blood, lung, and renal tissue samples for biochemical and histological analysis.

Biochemical Analysis

We added 10% phosphate buffer solution (PBS) to lung and kidney tissues and homogenized them. Following the homogenization, we centrifugated the samples for 30 minutes at 5000 rpm. We used the supernatant for SOD, GSH, MDA, and MPx determination. We measured MDA, MPx, SOD, and GSH levels according to the methods mentioned in previous studies (Bradley et al., 1982; Hu, 1994; Ohkawa et al., 1979; Sun et al., 1988). We used IL-1 β , IL-6, and IL-10 rat-specific ELISA kits (Elabscience, Wuhan, China) to evaluate the blood cytokine levels according to the protocols of the kits.

Histopathological Examination

At the end of the study, the rats were euthanized, and their kidney and lung tissues were placed in 10% buffered formaldehyde solution. After the fixation phase, the samples were shrunk, subjected to routine follow-up processes, and embedded in paraffin. Sections of 5 μ m were taken on a normal slide and stained with hematoxylin-eosin to examine for histopathological changes. Lung sections were examined for the thickness of the alveolar wall, and the kidney tissue for necrosis, degeneration, and glomerular damage under the light microscope.

Immunohistochemical (IHC) Staining

5 μ m sections from the tissue samples in the paraffin block were taken on a polylysine slide, and then the tissues were deparaffinized. To inactivate endogenous peroxidase activity, the tissues were kept in 3% hydrogen peroxide (H₂O₂) for 10 minutes. Then, boiling was performed in the antigen retrieval solution at 800w for 10 minutes to reveal the antigens in the tissues. Protein block solution was added to the tissues to prevent nonspecific binding. Sections washed with PBS were treated with Caspase-3 (Santa Cruz, Cat. No: sc-65497, Dilution:1/100) as the primary antibody. Then, the procedure specified by the Expose mouse and rabbit specific HRP/DAB detection IHC kit (abcam:

ab236466) was followed. Antigen-antibody binding to 3,3' diaminobenzidine using chromogen was made visible. Tissues counterstained with hematoxylin were examined for positive staining under the light microscope at 20x magnification.

Statistical Analysis

The IL-1 β , IL-6, and IL-10 results were evaluated via IBM SPSS 20.0 Package Program. The normality test was performed and then the One-Way ANOVA test was applied. Following these tests, the data were evaluated according to Duncan, one of the post-hoc tests, since it was parametrically appropriate. The data were represented as mean \pm standard deviation (SD). In the analyses, $p < 0.05$ values were considered statistically significant.

RESULTS

Biochemical Results

Figure 1 represents the blood cytokine levels. IL-1 β , IL-6, and IL-10 elevated significantly in the CLP group compared to the sham group (figure 1a,1b,1c $p < 0.05$). Figure 2 demonstrates the oxidant and antioxidant parameters in the renal tissue samples. SOD and GSH diminished in the CLP group compared to the sham group (figure 2a, figure 2b $p < 0.05$). MDA and MPx were raised in the CLP group compared to sham group (figure 2c, figure 2d $p < 0.05$). Figure 3 shows the oxidant and antioxidant parameters in the lung tissue samples. SOD and GSH decreased in the CLP group compared to the sham group (figure 3a, figure 3b $p < 0.05$). MDA and MPx elevated in CLP group compared to sham group (figure 3c, figure 3d $p < 0.05$).

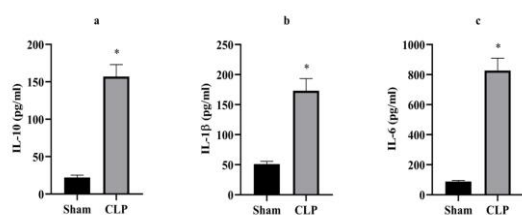


Figure 1. Cytokine levels of sham and CLP groups (* $p < 0.05$).

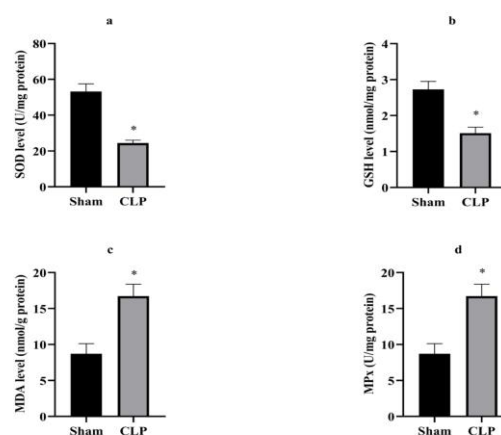


Figure 2. Antioxidant and oxidant parameters of renal tissue samples (* $p < 0.05$)

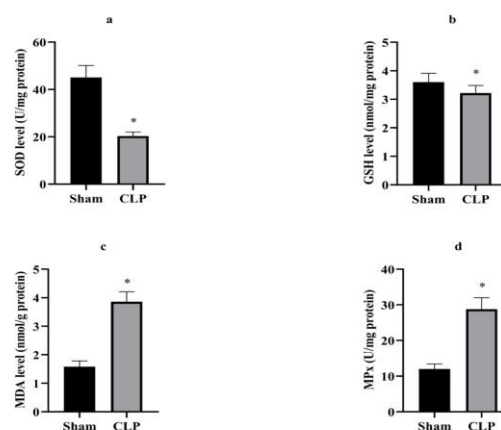


Figure 3. Antioxidant and oxidant parameters of lung tissue samples (* $p < 0.05$).

Histopathological Results

In the histopathological examination of the kidney tissue, normal glomerulus and tubular epithelium was observed in the sham group (figure 4a). In the CLP group, atrophy in the glomerulus and necrotic changes occurred in the tubular epithelium (figure 4b).

In the histopathological examination of the lung tissue, there was a normal lung histological appearance in the sham group. Alveolar wall thickness was normal (figure 4c). In the CLP group, thickening was detected in the interalveolar space due to mononuclear cell infiltration (figure 4d).

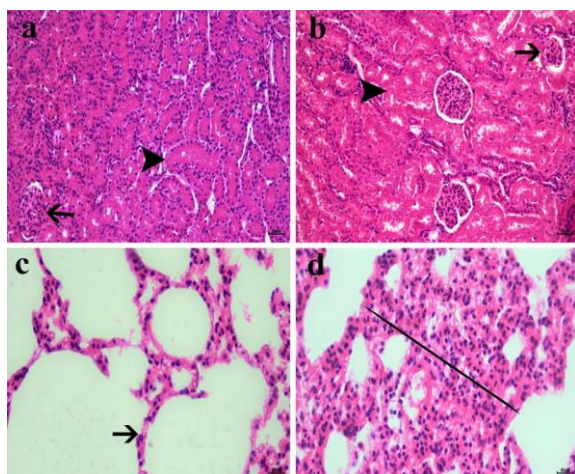


Figure 4. a) Sham group; normal kidney histological appearance. Normal glomerular (arrow) and tubular structures (arrowhead), b) CLP group; necrosis of the tubular epithelium (arrowhead) and atrophy of the glomerulus (arrow), c) Sham group; normal lung alveolar structure (arrow), d) CLP group; severe thickening of the alveolar wall. HEx20.

Immunohistochemical Results

There was no Caspase-3 immunopositivity in the kidney and lung tissue samples of the sham group (Figure 5a, Figure 5c). Intense Caspase-3 immunopositivity was detected in the kidney and lung tissues of the CLP group (Figure 5b, 5d). The immunopositivity occurred in the tubular epithelium and glomerular tuft in the kidney tissue, and it was observed in the inflammatory cells of the alveolar space in the lung tissue.

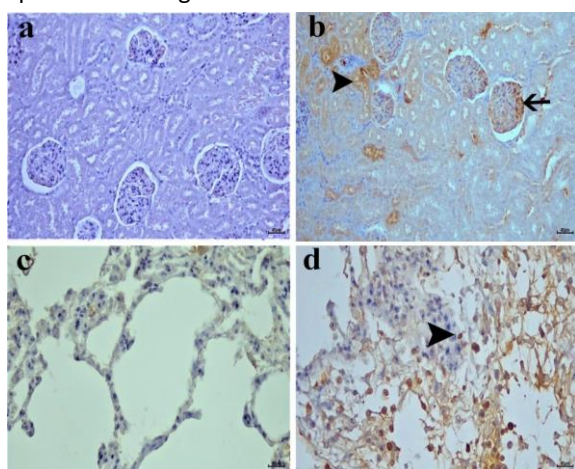


Figure 5. a) Sham group; kidney tissue negativity for caspase-3 immunopositivity. b) CLP group; intense Caspase-3 immunopositivity in tubular epithelium

(arrowhead) and glomerulus (arrow), c) Sham group; lung tissue negativity for caspase-3 immunopositivity, d) CLP group; intense Caspase-3 immunopositivity in inflammatory cells in the alveolar space (arrowhead), IHCx20.

DISCUSSION

Sepsis is a worldwide health problem enhancing death rates in intensive care units (Benz et al., 2016). It may result from various conditions, including trauma, surgery, and infection (Lan et al., 2017). An intestinal leakage-related microbial inflow to the peritoneal cavity may lead to sepsis (Angus & Wax, 2001). CLP is admitted a pragmatic experimental model to create realistic polymicrobial sepsis and it has been used and improved for over 30 years (Remick et al., 2000; Wichterman et al., 1980). CLP demonstrates similar symptoms to sepsis (D. Rittirsch et al., 2009).

During sepsis, an excessive inflammatory response occurs causing multiple organ failures (Prescott & Angus, 2018). Lungs (Andrews et al., 2006) and kidneys (Lan et al., 2017) are among the major affected organs by sepsis. During sepsis, oxidative stress harms the lungs and various proinflammatory cytokine levels increase including IL-1 β and IL-6 (Akpinar et al., 2014). A different study demonstrated high IL-1 β levels due to CLP-induced sepsis in rats (Liu et al., 2016). IL-1 β and IL-6 levels were raised in another CLP rat model (Zhao et al., 2018). IL-10 production is a strong response to an excessive inflammatory process (Oberholzer et al., 2002). Previous research has established that a CLP-induced sepsis model elevated IL-1 β , IL-6, and IL-10 levels (Ruiz et al., 2016). It has been suggested that IL-1 β , IL-6, and IL-10 increased in a rat model of CLP (Hu et al., 2019). In the current study, we observed high IL-1 β , IL-6 levels indicating an inflammatory process, and we also obtained high IL-10 levels compatible with an answer against inflammation due to sepsis.

GSH, a component of the antioxidant system, defends the body against oxidative stress (Rahman et

al., 2004). GSH was observed as decreased in a CLP rat model (Tripathi et al., 2022). SOD activity represents the removal of superoxide anions as a part of the antioxidant system and MDA may reflect the ROS production (Fang et al., 2002). ROS production promotes neutrophil infiltration (Liu et al., 2019) during the sepsis-related inflammatory response. MPO settles mainly in neutrophils and may reflect the neutrophil infiltration (Wang et al., 2019).

Akpınar et al. showed that SOD and GSH values declined, and MDA levels raised in a CLP-induced rat sepsis model (Akpınar et al., 2014). In another CLP-induced sepsis model, sepsis diminished SOD and GSH levels, and increased MPO values (Cadirci et al., 2010). MPO activity and MDA value increased, but GSH and SOD levels raised in a previous CLP-induced rat sepsis model (Liu et al., 2016). In our study, we obtained low SOD and GSH values, but high MDA and MPx levels which are compatible with these results.

Sepsis causes damage due to excessive inflammatory responses of the body. The damage may be shown as histopathological changes in the tissues (Liu et al., 2016; L. Song et al., 2018). We observed changes in renal and lung tissues on behalf of sepsis compatible with previous studies. Caspase-3 involves in apoptotic pathways (Yu Wang et al., 2018). Many recent studies have shown that Caspase-3 expression raises during sepsis (Kostakoglu et al., 2020; Yu Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018). We found Caspase-3 immunopositivity in our tissue samples indicating sepsis-related damage which is similar to the literature. Histopathological and immunohistochemical data supported the efficiency of the current sepsis model in addition to the biochemical findings.

CONCLUSIONS

The current study has presented a mid-grade CLP-induced rat sepsis model. We assessed blood cytokine levels and tissue oxidant/antioxidant parameters. In addition, we examined renal and lung tissues for histopathological and immunohistochemical evaluation. The results

demonstrated a meaningful sepsis picture indicating a successful CLP model in concert with the literature which we may prefer to use in further CLP-induced sepsis models.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was designed to create and improve a CLP animal model for further CLP-related studies. It was supported by Atatürk University Department of Scientific Research Project as a research start-up support project (Project ID:8791).

REFERENCES

1. Akpınar E., Halici Z., Cadirci E., Bayir Y., Karakus E., Calik M., Topcu A., & Polat B., 2014. What is the role of renin inhibition during rat septic conditions: preventive effect of aliskiren on sepsis-induced lung injury. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 387(10), 969-978.
2. Andrews P., Azoulay E., Antonelli M., 2006. Year in review in intensive care medicine 2005. I. Acute respiratory failure and acute lung injury, ventilation, hemodynamics, education, renal failure. *Intensive Care Medicine*, 32(2), 207-216.
3. Angus DC., & Wax RS., 2001. Epidemiology of sepsis: An update. *Critical Care Medicine*, 46-47.
4. Bastarache JA., & Matthay MA., 2013. Cecal Ligation Model of Sepsis in Mice: New Insights*. *Critical Care Medicine*, 41(1).
5. Bayraktutan Z., Dincer B., Keskin H., Kose D., Bilen A., Toktay E., Sirin B., & Halici Z., 2021. Roflumilast as a Potential Therapeutic Agent for Cecal Ligation and Puncture-Induced Septic Lung Injury. *Journal of Investigative Surgery*, 1-9.
6. Benz F., Roy S., Trautwein C., Roderburg C., & Luedde T., 2016. Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. *International Journal of*

- Molecular Sciences, 17(1).
7. Bi J., Cui R., Li Z., Liu C., & Zhang J., 2017. Astaxanthin alleviated acute lung injury by inhibiting oxidative/nitrative stress and the inflammatory response in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 974-982.
 8. Bradley PP., Priebat DA., Christensen RD., & Rothstein G., 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *The Journal of investigative dermatology*, 78(3), 206-209.
 9. Cadirci E., Altunkaynak BZ., Halici Z., Odabasoglu F., Uyanik MH., Gundogdu C., Suleyman H., Halici M., Albayrak M., & Unal B., 2010. A-lipoic acid as a potential target for the treatment of lung injury caused by cecal ligation and puncture-induced sepsis model in rats. *Shock*, 33(5).
 10. Cecconi M., Evans L., Levy M., & Rhodes A., 2018. Sepsis and septic shock. *The Lancet*, 392(10141), 75-87.
 11. Cheng Y., Hu X., Liu C., Chen M., Wang J., Wang M., Gao F., Han J., Zhang C., Sun D., & Min R., 2017. Gelsolin Inhibits the Inflammatory Process Induced by LPS. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(1), 205-212.
 12. Dellinger RP., Levy MM., Rhodes A., 2013. The Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including The Pediatric, S. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. *Intensive Care Medicine*, 39(2), 165-228.
 13. Dröge W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
 14. Fang YZ., Yang S., & Wu G., 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18(10), 872-879.
 15. Galanos C., & Freudenberg MA., 1993. Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology*, 187(3), 346-356.
 16. Hu J., Tang Z., Xu J., Ge W., Hu Q., He F., Zheng G., Jiang L., Yang Z., & Tang W., 2019. The inhibitor of interleukin-3 receptor protects against sepsis in a rat model of cecal ligation and puncture. *Mol Immunol*, 109, 71-80.
 17. Hu ML., 1994. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in Enzymology*, 233(C), 380-385.
 18. Hubbard WJ., Choudhry M., Schwacha MG., Kerby JD., Rue LW., 3rd Bland K. I., & Chaudry I. H., 2005. Cecal ligation and puncture. *Shock*, 24 Suppl 1, 52-57.
 19. Kostakoglu U., Topcu A., Atak M., Tumkaya L., Mercantepe T., & Uydu HA., 2020. The protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor against cecal ligation and puncture-induced sepsis via oxidative stress and inflammation. *Life Sci*, 241, 117051.
 20. Lan KC., Chao SC., Wu HY., Chiang CL., Wang CC., Liu SH., & Weng TI., 2017. Salidroside ameliorates sepsis-induced acute lung injury and mortality via downregulating NF- κ B and HMGB1 pathways through the upregulation of SIRT1. *Scientific Reports*, 7(1), 12026.
 21. Lingaraju MC., Pathak NN., Begum J., 2015. Betulinic acid attenuates lung injury by modulation of inflammatory cytokine response in experimentally-induced polymicrobial sepsis in mice. *Cytokine*, 71(1), 101-108.
 22. Liu CH., Zhang WD., Wang JJ., & Feng SD., 2016. Senegenin Ameliorate Acute Lung Injury Through Reduction of Oxidative Stress and Inhibition of Inflammation in Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis Rats. *Inflammation*, 39(2), 900-906.
 23. Liu S., Yue Y., Pan P., Zhang L., Su X., Li H., Li H., Li Y., Dai M., Li Q., & Mao Z., 2019. IRF-1 Intervention in the Classical ROS-Dependent Release of NETs during LPS-Induced Acute Lung Injury in Mice. *Inflammation*, 42(1), 387-403.
 24. Makled MN., El-Awady MS., Abdelaziz RR., Atwan N., Guns ET., Gameil NM., Shehab El-Din AB., & Ammar EM., 2016. Pomegranate protects liver against cecal ligation and puncture-induced oxidative stress and inflammation in rats

- through TLR4/NF- κ B pathway inhibition. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43, 182-192.
25. Mikkelsen ME., Shah CV., Meyer NJ., Gaieski D. F., Lyon S., Miltiades AN., Goyal M., Fuchs BD., Bellamy SL., & Christie JD., 2013. The Epidemiology of Acute Respiratory Distress Syndrome in Patients Presenting to the Emergency Department With Severe Sepsis. *Shock*, 40(5).
26. Oberholzer A., Oberholzer C., & Moldawer LL., 2002. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Critical Care Medicine*, 56-60.
27. Ohkawa H., Ohishi N., & Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 95(2), 351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3).
28. Park I., Kim M., Choe K., Song E., Seo H., Hwang Y., Ahn J., Lee SH., Lee JH., Jo YH., Kim K., Koh G. Y., & Kim P., 2019. Neutrophils disturb pulmonary microcirculation in sepsis-induced acute lung injury. *Eur Respir J*, 53(3).
29. Polat B., Cadirci E., Halici Z., Bayir Y., Unal D., Bilgin BC., Yuksel TN., & Vancelik S., 2013. The protective effect of amiodarone in lung tissue of cecal ligation and puncture-induced septic rats: a perspective from inflammatory cytokine release and oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 386(7), 635-643.
30. Potjo M., Theron AJ., Cockeran R., Sipholi NN., Steel HC., Bale TV., Meyer PWA., Anderson R., & Tintinger GR., 2019. Interleukin-10 and interleukin-1 receptor antagonist distinguish between patients with sepsis and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *Cytokine*, 120, 227-233.
31. Prescott HC., & Angus DC., 2018. Enhancing Recovery From Sepsis: A Review. *JAMA*, 319(1), 62-75.
32. Rahman I., Biswas SK., Jimenez LA., Torres M., & Forman HJ., 2004. Glutathione, Stress Responses, and Redox Signaling in Lung Inflammation. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(1-2), 42-59.
33. Remick DG., Newcomb DE., Bolgos GL., & Call D. R., 2000. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, 13(2), 110-111.
34. Rhodes A., Evans LE., Alhazzani W., Levy MM., Antonelli M., Ferrer R., Kumar A., 2017. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical Care Medicine*, 45(3), 486-552.
35. Rittirsch D., Huber-Lang MS., Flierl MA., & Ward PA., 2009. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc*, 4(1), 31-36.
36. Ruiz S., Vardon-Bounes F., Merlet-Dupuy V., Conil JM., Buléon M., Fourcade O., Tack I., & Minville V., 2016. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive care medicine experimental*, 4(1), 22-22.
37. Sadowitz B., Roy S., Gatto LA., Habashi N., & Nieman G., 2011. Lung injury induced by sepsis: lessons learned from large animal models and future directions for treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9(12), 1169-1178.
38. Schabbauer G., (2012). Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 9(1), e17-e21.
39. Seibt TM., Proneth B., & Conrad M., 2019. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication. *Free radical biology & medicine*, 133, 144-152.
40. Seymour CW., Liu VX., Iwashyna TJ., Brunkhorst FM., Rea TD., Scherag A., 2016. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 762-774.

41. Song J., Hu D., He C., Wang T., Liu X., Ma L., Lin Z., & Chen Z., 2013. Novel biomarkers for early prediction of sepsis-induced disseminated intravascular coagulation in a mouse cecal ligation and puncture model. *J Inflamm (Lond)*, 10(1), 7.
42. Song L., Zou Y., & Cao Z., 2018. Comparison of two different models of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. *Journal of Surgical Research*, 229, 277-282.
43. Srivastava A., Maggs JL., Antoine DJ., Williams DP., Smith DA., & Park BK., 2010. Role of Reactive Metabolites in Drug-Induced Hepatotoxicity. In J. Uetrecht (Ed.), *Adverse Drug Reactions*, 165-194.
44. Sun Y. Oberley LW., & Li Y., 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 34(3), 497-500.
45. Till GO., Hatherill JR., Tourtellotte WW., Lutz MJ., & Ward PA., 1985. Lipid peroxidation and acute lung injury after thermal trauma to skin. Evidence of a role for hydroxyl radical. *American Journal of Pathology*, 119(3), 376-384.
46. Tripathi AS., Awasthi S., Maurya RK., Yasir M., Mohapatra L., & Srivastav V., 2022. Protective effect of vanillin on the management of cecal ligation and puncture induced sepsis rat model. *Microbial Pathogenesis*, 165, 105493-105493.
47. Wang X., An X., Wang X., Hu X., Bi J., Tong L., Yang D., Song Y., & Bai C., 2019. Peroxiredoxin 6 knockout aggravates cecal ligation and puncture-induced acute lung injury. *International immunopharmacology*, 68, 252-258.
48. Wang Y., Wang X., Zhang L., & Zhang R., 2018. Alleviation of Acute Lung Injury in Rats with Sepsis by Resveratrol via the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Nuclear Factor-Erythroid 2 Related Factor 2/Heme Oxygenase-1 (PI3K/Nrf2/HO-1) Pathway. *Medical Science Monitor*, 24, 3604-3611.
49. Wichterman KA., Baue AE., & Chaudry IH., 1980. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*, 29(2), 189-201. [https://doi.org/10.1016/00224804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/00224804(80)90037-2).
50. Xiao M., Zhu T., Zhang W., Wang T., Shen YC., Wan QF., & Wen FQ., 2014. Emodin Ameliorates LPS-Induced Acute Lung Injury, Involving the Inactivation of NF- κ B in Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11).
51. Zhang J., Ma L., Hashimoto Y., Wan X., Shan J., Qu Y., & Hashimoto K., 2021. (R)-Ketamine ameliorates lethal inflammatory responses and multi-organ injury in mice induced by cecum ligation and puncture. *Life Sciences*, 284, 119882.
52. Zhao W., Jia L., Yang HJ., Xue X., Xu WX., Cai JQ., Guo RJ., & Cao CC., 2018. Taurine enhances the protective effect of Dexmedetomidine on sepsis-induced acute lung injury via balancing the immunological system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 103, 1362-1368.
53. Zimmerman JJ., Akhtar SR., Caldwell E., & Rubenfeld GD., 2009. Incidence and Outcomes of Pediatric Acute Lung Injury. *Pediatrics*, 124(1), 87-95.



Koenzim Q10 ve Hesperidinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi

Betül APAYDIN YILDIRIM^{1a}✉

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.

ORCID: 0000-0002-0361-6148^a

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
10.08.2022	06.09.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:
Apaydın Yıldırım B: Koenzim Q10 ve Hesperidinin Ratlarda Alt Ekstremitte İskemi-Reperfüzyon Hasarında TAS ve TOS Düzeylerine Etkisi. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 90-95, 2022.

Öz: Alt ekstremitte iskemi reperfüzyon (İR) hasarında Koenzim Q10 (CoQ10) ve Hesperidinin (HESP) TAS ve TOS düzeylerine etkilerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışmada 28 adet 200-250 gr ağırlığında Sprague- Dawley erkek ratlar; Kontrol (K), İskemi reperfüzyon (İR), İR+CoQ10 ve İR+HESP grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. İR+CoQ10 grubuna iskemi oluşturulmadan önce 10mg/kg dozunda 8 saat arayla 3 kez 0.5mL CoQ10, İR+HESP grubuna ise 100mg/kg dozunda 8 saat arayla 3 kez 0.5mL Hesperidin gastrik gavaj ile verildi. Kontrol grubu hariç diğer 3 gruba anestezi altında sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı. Çalışma sonunda ratlardan anestezi altında kan örnekleri alınarak total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan statü (TOS) düzeyleri ölçüldü. İR grubunda TOS düzeyi tüm gruplardan yüksek iken, iskemi ile birlikte CoQ10 ve HESP uygulamasının bu düzeyleri İR grubuna göre anlamlı olarak düşürdüğü, TAS düzeylerini ise iskemi ile birlikte uygulanan antioksidanların İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yükselttiği tespit edildi. Sonuç olarak ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında CoQ10 ve HESP TOS düzeyini azaltarak, TAS düzeyini arttırarak oksidatif hasara karşı koruyucu etkiler gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hesperidin, İskemi, Koenzim Q10, Reperfüzyon, Turnike.

The Effect of Coenzyme Q10 and Hesperidin on TAS and TOS Levels in Lower Extremity Ischemia-Reperfusion Injury in Rats

Abstract: It was aimed to determine the effects of Coenzyme Q10 (CoQ10) and Hesperidin (HESP) on TAS and TOS levels in lower extremity ischemia-reperfusion (IR) injury. In the study, 28 Sprague-Dawley male rats weighing 200-250 g were divided into 4 groups as Control (C), Ischemia reperfusion (IR), IR+CoQ10 and IR+HESP groups. Before ischemia was induced in the IR+CoQ10 group, 0.5mL CoQ10 was administered at a dose of 10mg/kg 3 times with 8-hour intervals, and to the IR+HESP group at a dose of 100mg/kg, 0.5mL Hesperidin was administered 3 times at 8-hour intervals by gastric gavage. Except for the control group, a tourniquet was applied to the left lower extremities and 2 hours of ischemia and 2 hours of reperfusion were applied to the other 3 groups under anesthesia. At the end of the study, blood samples were taken from the rats under anesthesia and total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) levels were measured. While TOS level was higher in the IR group than in all groups, it was determined that CoQ10 and HESP application with ischemia significantly decreased these levels compared to the IR group, and antioxidants applied together with ischemia increased the TAS levels statistically significantly compared to the IR group. It was determined that it showed protective effects by decreasing the CoQ10 and HESP TOS level and increasing the TAS level in experimentally induced ischemia-reperfusion injury of the lower extremity in rats.

Keywords: Coenzyme Q10, Hesperidin, Ischemia, Reperfusion, Tourniquet.

✉ Betül APAYDIN YILDIRIM

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: betul_apaydin@hotmail.com

GİRİŞ

Turnike, distalde kalan dokulara kan akışının engellenmesi ve nöromusküler yapılara mekanik olarak etki eden ve fizyolojik olmayan bir uygulama olmasına rağmen ameliyat süresini kısaltmak, kan kaybını azaltmak ve kansız bir ortamda cerrahi işlemleri kolaylaştırmak için ekstremite sıklıkla kullanılan bir uygulamadır. Turnike uygulamasına bağlı olarak ekstremite iskemisi/reperfüzyon hasarı, vasküler yaralanmalar, tromboemboli, paralizler ve kompartman sendromu mortalite ve morbidite nedeni olmaktadır. Turnike kullanımı sıklıkla şiddetli ekstremite kanamasının tedavisinde kullanılan birincil uygulamadır.

Bir dokudaki kan akımının herhangi bir sebeple durması, dokunun ihtiyacı olan metabolitlerin ve oksijenin temin edilememesi durumu iskemisi olarak tanımlanır. Reperfüzyon ise kan akımının durduğu dokuda kan akımının yeniden sağlanması olarak tanımlanır. İskemi esnasında hücrel fonksiyon bozukluğu, toksik metabolitlerin hücrelerde birikmesi ve nekroz gibi durumlar birtakım biyokimyasal reaksiyonların gerçekleşmesiyle iskeminin gerçekleştiği dokularda arteriyel kan ile bolca oksijen gelmesiyle serbest radikallerin ve oksidatif kapasitesi yüksek moleküllerin miktarlarının artışına sebep olur. Hücrelerde oluşan serbest oksijen radikalleri ve hücre organellerini, membran proteinlerini, lipitlerini ve nükleik asitleri oksidasyona uğratarak, hasara yol açarak oksidatif strese neden olurlar (Basmacı, 2017; Bayrak, 2017; Kılıç, 2014). Total antioksidan statü (TAS) plazma ve vücut sıvılarındaki tüm antioksidanların etkisini gösterirken, total oksidan statü (TOS) tüm oksidanların toplam etkisini gösterir (Aslan ve ark., 2014).

Alt ekstremite iskemisi reperfüzyon (İR) hasarı, aort cerrahisinde başta olmak üzere miyokard infarktüsü, serebrovasküler olaylar, sepsis, organ transplantasyonu, şok, yanık, periferik ve mezenter arter embolilerinde uygulanan trombolitik tedaviler, pankreatit gibi cerrahi ve travmatik durumlarda ortaya çıkan iskeminin ve hipovoleminin tedavisi

sırasında oluşurken cerrahi girişim esnasında ekstremitelere yapılan turnikeler reperfüzyon hasarı sebeplerindedir (Eltzschig & Eckle, 2011).

Kırmızı et ve deniz ürünlerinde bulunan Koenzim Q10 (CoQ10), meyve (özellikle turunçgil kabuklarında) ve sebzelerde bulunan antioksidan olan Hesperidin (HESP) ve flavonoidleri antioksidan, antialerjik, antiinflamatuvar, antikanser, antiapoptotik ve antiiskemik olarak etki göstermektedir (Ertekin & Apaydın Yıldırım, 2018; Akbulut ve ark., 2019). CoQ10 oksidatif stresi önler, ATP sentezinde önemli rol oynar, İR sırasında oksidatif streste oluşan hasarı önler, proteinlerin ve lipidlerin peroksidasyonunu önler (Akbulut ve ark., 2019). Hesperidin diğer flavonoidlerden farklı olarak 3 OH grubuna sahip olarak en güçlü antioksidan potansiyeline sahiptir (Kara ve ark., 2014).

Ekstremitte akut İR yaralanmalarından sorumlu hücrel ve moleküler mekanizmalar tam olarak ortaya konulmamıştır. Bazı çalışmalar, akut İR sırasında hasarlı iskelet kaslarında inflamatuvar sitokinlerin ve reaktif oksijen türlerinin aşırı üretiminin, nöronal hasara ve iskelet kası fonksiyon eksikliğine neden olduğunu göstermiştir (Eltzschig & Eckle, 2011). İR hasarının önlenmesinde birçok antioksidan madde kullanılmaktadır. Koenzim Q10 ve Hesperidin bioflavonoid oldukları için oksidatif hasara karşı koruyucu oldukları kanıtlanan antioksidan aktiviteye sahiptirler ve süperoksit gibi reaktif nitrojen ve oksijen türlerini ortadan kaldırıcı etkiye sahiptirler.

Şimdiye kadar kas dokusunda turnikeye bağlı iskemisi/reperfüzyon hasarını azaltmak için birtakım kimyasallar, ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir. Bu doğrultuda da uzun yıllardır yararlı etkileri bilinen sentetik ve bitkisel olan antioksidan maddelerin etkileri araştırılmaya başlanmıştır. Bu çalışmada, Koenzim Q10 ve Hesperidin uygulanan ratlarda deneysel olarak oluşturulan alt ekstremite iskemisi-reperfüzyon hasarının TAS ve TOS düzeylerine etkileri incelendi.

MATERYAL ve METOT

Deney Materyallerinin Temini

Çalışmada antioksidan olarak kullanılan Koenzim Q10 (SOLGAR) ve Hesperidin (Sigma Aldrich St Louis, USA) piyasadan temin edildi. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'nın 36643897-000-E-1800090274/59 sayılı kararı ile onaylandıktan sonra deneyde 28 adet Sprague Dawley 200-250 g erkek rat Atatürk Üniversitesi'ne bağlı Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) tarafından sağlandı. Ratların canlı ağırlıkları tartılarak gruplar oluşturuldu. Ratlar 12 saat aydınlık/12 saat karanlık siklusunda, 21°C (+/-2) ortamda 7 gün ortama adaptasyonları sağlandıktan sonra denemeye başlandı. Ratlar su ve pelet yem ile ad libitum beslendi. Ratlar; Kontrol Grubu (K), İskemi/Reperfüzyon Grubu (İ/R Grubu), İ/R+CoQ10 Grubu, İ/R+Hesperidin Grubu olmak üzere rastgele seçilip kafeslere yerleştirildi. Opere edilecek ratlar bir gece önce aç bırakıldı ama suya erişimleri serbest bırakıldı. Tüm ratlar Ksilazin (8 mg/kg) ve Ketamin (60 mg/kg) anestezi altına alındı, kontrol grubu hariç diğer 3 gruba anestezi altında sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp 2 saat iskemi, 2 saat reperfüzyon uygulandı.

Deneysel Uygulamalar

Kontrol Grubu: İskemi oluşturulmadan önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL % 0.25'lik CMC gastrik gavaj ile uygulandı. İR oluşturulmaksızın anestezi altında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR Grubu: Anestezi altına alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu (pençelerin siyanotik olması ve sıcaklığın düşük olması iskeminin gerçekleştiğini gösterdi), iki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR+CoQ10 Grubu: İskemiden önce ratlara önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL 10mg/kg CoQ10 (%0.25'lik CMC içerisinde çözüldü) gastrik gavaj ile uygulandı. Otuz dakika sonra alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu. İki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

İR+Hesperidin Grubu: İskemiden önce ratlara önce 3 kez, 8 saat ara ile 0.5 mL 100mg/kg HESP (%0.25'lik CMC içerisinde çözüldü) gastrik gavaj ile uygulandı. Otuz dakika sonra alınan ratların sol alt ekstremitelerine turnike uygulanıp iki saat iskemi oluşturuldu, iki saat sonunda turnikeler açılıp iki saat reperfüzyon oluşturuldu (pençelerin pembeleşerek sıcaklığın artışı ile reperfüzyonun gerçekleştiği gözlemlendi), sonrasında biyokimyasal analizler için Aorta abdominalisten kan alındı.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analizler için lityum heparinli tüplere alınan kan 10 dakika 3000rpm'de santrifüj edilerek plazmaları çıkartılıp biyokimyasal analizler yapıncaya kadar -20 °C'de derin dondurucuda saklandı. Elde edilen plazmalarda TOS ve TAS düzeylerine (Rel Assay) ticari olarak alınan ELİSA kitinde belirtilen protokol uygulanarak Biotek ELISA Reader (Bio Tek µQuant MQX200 Elisa reader/USA) ile ölçümler gerçekleştirildi. TAS düzeyinin ölçülmesinden sonra OSİ hesaplanması için TAS birimi µmol'e çevrilerek aşağıda bulunan formüle göre hesaplamalar yapıp OSİ sonuçları arbitrary unit (AU) şeklinde belirtildi.

OSİ= (TOS, µmol H₂O₂ Equ./L / TAS, mmol Trolox Equ./L) X 100

İstatistiksel analizler: Elde edilen sonuçların istatistik değerlendirilmesi SPSS 22.00 paket programı kullanılarak normal dağılıma uygunluğuna bakıldı. Veriler normal dağılım gösterdiği için One-Way ANOVA analizi yapıldı. One-Way ANOVA analizi

sonucunda grupların homojen olduğu belirlenerek tüm gruplar arasındaki farklılığın çoklu karşılaştırılması için Tukey testi yapıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırmada $p < 0.05$ önemli olarak kabul edildi. Ortalama \pm standart hata olarak belirtildi.

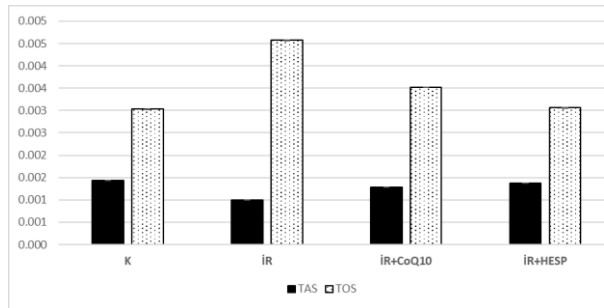
BULGULAR

İR grubunda plazma TOS düzeyi kontrol grubuna göre yükselirken, İR+CoQ10 ve İR+HESP gruplarında TOS düzeyi İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş saptandı ($p < 0.001$). İR grubunda plazma TAS düzeyi İR+CoQ10 ve İR+HESP gruplarına göre anlamlı olarak azaldığı tespit edildi. OSİ, İR grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak yüksek tespit edildi ($p < 0.001$) (Tablo 1, Şekil 1).

Tablo 1. CoQ10 ve Hesperidinin plazma TAS ve TOS düzeyleri üzerine etkisi

Table 1. Effect of CoQ10 and Hesperidin on plasma TAS and TOS levels.

Gruplar	TAS (mmol Trolox Equ./L)	TOS ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ EQU./L)	OSİ (AU)
K	1.43 \pm 0.00a	3.03 \pm 0.01 ^d	0.21 \pm 0.00 ^b
İR	0.99 \pm 0.00 ^d	4.57 \pm 0.01 ^a	0.46 \pm 0.00 ^a
İR+CoQ10	1.28 \pm 0.00 ^c	3.52 \pm 0.00 ^b	0.24 \pm 0.00 ^b
İR+HESP	1.38 \pm 0.00 ^b	3.06 \pm 0.01 ^c	0.22 \pm 0.00 ^b
p	***	***	***



Şekil 1. Tüm gruplarda plazma TAS ve TOS düzeyleri.

Figure 1. Plasma TAS and TOS levels in all groups.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Ülkemizde de tüm Dünya'da da önemli mortalite ve morbiditeye sebep olan alt ekstremite iskemisi sıklıkla görülmektedir. İR sürecinde reperfüzyonda hasarın büyüklüğü ve reaktif oksijen radikallerinin (polimorfonükleer lökositlerden serbest oksijen radikallerinin salınımı gerçekleşir) dokularda hasara yol açtığı bilinmektedir. İskelet kasları, alt ekstremite İR hasarında önemlidir. İskeminin uzun süre devam etmesi hücrelerin bütünlüğünün bozulmasına ve hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Tiryakioğlu ve ark., 2015).

Periferik vasküler travma, periferik vasküler cerrahi, akut arteriyel oklüzyon ve ekstremite replantasyonu esnasında ekstremite akut iskemisi ile karşılaşmak mümkündür. Reperfüzyonun sağlanmasıyla ekstremite kaybı, akut böbrek, kas, akciğer, karaciğer ve solunum yetmezliği, çoklu organ yetmezlikleri ve müdahaleler gecikirse ölüm ile sonuçlanabilmektedir. İskemik hasara en duyarlı olan doku iskelet kasıdır ve alt ekstremite İR hasarında etkilenmektedir ve reperfüzyon sürecinde kas hasarının miktarı önem taşımaktadır (Aksu ve ark., 2015).

Antioksidan ajanlar iskemi reperfüzyon hasarını önlemede ve tedavide sıklıkla kullanılmaktadır. Koenzim Q10 ve hesperidin önemli antioksidan ve antiinflamatuvar özelliklerinden dolayı alt ekstremite İR hasarında terapötik bir ajan olarak kullanılabilir (Ertekin & Apaydın, 2018). Ertekin ve Apaydın (2018)'in bulguları ve yapılan çalışmanın bulguları değerlendirildiğinde CoQ10 ve HESP'nin iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri ortaya konulmuştur.

Sonuç olarak, CoQ10 ve HESP oksidatif stresi azaltarak ratlarda İR'nin neden olduğu iskelet kası hasarına karşı koruyucu ve yardımcı terapötik ajanlar olarak kullanılabilir kanaatine varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Abbas, A., Iqbal, Z., Abbas, R. Z., Khan, M. K., Khan, J. A., Mahmood, M. S., et al. (2017). In vivo anticoccidial effects of *Beta vulgaris* (sugar beet) in broiler chickens. *Microbial pathogenesis*, 111, 139-144.
2. Abd El Megid, A. D., Khaled, M., Emam, M. A., & Adel, A. (2018). Biochemical role of zinc oxide and propolis nanoparticles in protection rabbits against coccidiosis. *Benha Veterinary Medical Journal*, 34(1), 314-328.
3. Aboelhadid, S. M., El-Ashram, S., Hassan, K. M., Arafa, W. M., & Darwish, A. B. (2019). Hepato-protective effect of curcumin and silymarin against *Eimeria stiedae* in experimentally infected rabbits. *Livestock Science*, 221, 33-38.
4. Aboelhadid, S. M., Hashem, S., Abdel-Kafy, E. S., Mahrous, L. N., Farghly, E. M., Abdel-Baki, A. A. S., et al. (2021). Prebiotic supplementation effect on *Escherichia coli* and *Salmonella* species associated with experimentally induced intestinal coccidiosis in rabbits. *PeerJ*, 9, e10714.
5. Abu El Ezz, N., Aboelsoued, D., Hassan, S., Abdel Megeed, K., & El-Metenawy, T. (2020). Therapeutic effect of *Moringa oleifera* and *Thymus vulgaris* oils against hepatic coccidiosis in experimentally infected rabbits. *Tropical Biomedicine*, 37(4), 1018-1028.
6. Ayan, A., Ahmed, I., Khan, J. M., Munir, S., Hussain, M., Khan, A. K., et al. (2020). Hematological changes and comparative efficacy of allopathic and herbal drugs on coccidiosis in rabbits. *Baltica*, 33(2), 78-99.
7. Benato L, Hastie P, O'Shaughnessy P, Murray JA, Meredith A. Effects of probiotic *Enterococcus faecium* and *Saccharomyces cerevisiae* on the faecal microflora of pet rabbits. *J Small Anim Pract*. 2014 Sep;55(9):442-6.
8. Çam, Y., Atasever, A., Eraslan, G., Kibar, M., Atalay, Ö., Beyaz, L., et al. (2008). *Eimeria stiedae*: experimental infection in rabbits and the effect of treatment with toltrazuril and ivermectin. *Experimental parasitology*, 119(1), 164-172.
9. Dorman, H. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*, 88(2), 308-316.
10. El-Ashram, S. A., Aboelhadid, S. M., Abdel-Kafy, E.-S. M., Hashem, S. A., Mahrous, L. N., Farghly, E. M., et al. (2019). Prophylactic and therapeutic efficacy of prebiotic supplementation against intestinal coccidiosis in rabbits. *Animals*, 9(11), 965.
11. El-Ghoneimy, A., & El-Shahawy, I. (2017). Evaluation of amprolium and toltrazuril efficacy in controlling natural intestinal rabbit coccidiosis. *Iranian journal of veterinary research*, 18(3), 164.
12. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol*. 2017 Aug;14(8):491-502.
13. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-14.
14. Indrasanti, D., Indradji, M., Hastuti, S., Aprilliyani, E., Fatikha, F., & Rosyadi, K. (2017). The administration of garlic extract on *Eimeria stiedae* oocysts and the hematological profile of the coccidia infected rabbits. *Media Peternakan*, 40(3), 158-164.
15. Jahangiri, F., Razavi, S., & Nazifi, S. (2018). Comparative effect of *Melissa officinalis*

- aqueous extract, sulfadimidine, and vitamin E–selenium on antioxidant parameters in rabbit experimental coccidiosis. *Comparative Clinical Pathology*, 27(2), 371-378.
16. KN, A. M., NM, A. E., & Abdel-Rahman, E. H. (2005). Protective effect of *Eimeria stiedae* coproantigen against hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*, 35(2), 581-595.
 17. Leone, A., Spada, A., Battezzati, A., Schiraldi, A., Aristil, J., & Bertoli, S. (2015). Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. *International journal of molecular sciences*, 16(6), 12791-12835.
 18. Ogolla, K. O., Gathumbi, P. K., Waruiru, R. M., Okumu, P. O., Chebet, J., & Kitala, P. M. (2018). Efficacy of sulphachloropyrazine, amprolium hydrochloride, trimethoprim-sulphamethoxazole, and diclazuril against experimental and natural rabbit coccidiosis. *Journal of veterinary medicine*, 2018.
 19. Pérez-Fonseca, A., Alcalá-Canto, Y., Salem, A. Z., & Alberti-Navarro, A. B. (2016). Anticoccidial efficacy of naringenin and a grapefruit peel extract in growing lambs naturally-infected with *Eimeria* spp. *Veterinary parasitology*, 232, 58-65.
 20. Petrova, Y. (2019). Pasteurellosis And Emeriosis–Worldwide Problems In The Rabbit Farms: A Review. *Trakia Journal of Sciences*, 17(1), 67.
 21. Pourali, M., Kermanshahi, H., Golian, A., Razmi, G. R., & Soukhtanloo, M. (2014). Antioxidant and anticoccidial effects of garlic powder and sulfur amino acids on *Eimeria*-infected and uninfected broiler chickens. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(3), 227-232.
 22. Qamar, F., Sharif, R., Qamar, M., & Basharat, A. (2013). Comparative efficacy of sulphadimidine sodium, toltrazuril and amprolium for coccidiosis in rabbits. *Science International (Lahore)*, 25(2), 295-298.
 23. Rasooli, I., Rezaei, M. B., & Allameh, A. (2006). Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International journal of infectious diseases*, 10(3), 236-241.
 24. Rivero-Perez, N., Hernández-Alvarado, J. L., Valladares-Carranza, B., Delgadillo-Ruiz, L., Ojeda-Ramírez, D., Sosa-Gutiérrez, C. G., et al. (2019). *Salix babylonica* L. as a natural anticoccidial alternative in growing rabbits. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2019.
 25. Sivajothi, S., Reddy, B. S., & Rayulu, V. (2014). Intestinal coccidiosis infection in domestic rabbits. *International Journal of Biological Research*, 2(2), 48-50.
 26. Sivajothi, S., Reddy, B. S., & Rayulu, V. (2016). Study on impression smears of hepatic coccidiosis in rabbits. *Journal of Parasitic Diseases*, 40(3), 906-909.
 27. Sorour, S. S., Abou Asa, S., Elhawary, N. M., Ghazy, E. W., Abd El Latif, A., El-Abasy, M. A., et al. (2018). Anticoccidial and hepatoprotective effects of artemisinin liquid extract, cinnamon essential oil and clove essential oil against *Eimeria stiedae* infection in rabbits. *Tropical biomedicine*, 35(4), 926-943.
 28. Worku, M., Franco, R., & Baldwin, K. (2009). Efficacy of garlic as an anthelmintic in adult Boer goats. *Archives of Biological Sciences*, 61(1), 135-140.



TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ
Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY
LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ
JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES

Farelere Uygulanan Deneysel Tip 1 Diyabet Modelleri

Semin Gedikli^{1a}✉, Ali Can Özcan^{1b}

1. Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye.

ORCID: 0000-0001-8238-7226^a, 0000-0001-8636-0610^b

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
12.08.2022	14.09.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Gedikli S, Özcan AC: Farelere Uygulanan Deneysel Tip 1 Diyabet Modelleri. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 96-104, 2022.

Öz: Diyabet, çağımızın en önemli sağlık sorunları arasında yer almaktadır. Pankreas Langerhans adacıklarındaki β hücreleri tarafından salgılanan insülin, kan glikoz seviyesinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu hücrelerin zarar görmesi ya da insülin salınımının farklı bir yolla engellenmesi sonucu tip 1 diyabet şekillenmektedir. Hayvan türlerinde de beta hücresi hasarına bağlı deneysel tip 1 diyabet oluşturulabilmektedir. Her hayvan türü kendine özgü olarak kan glikoz seviyesine sahiptir. Bu düzeyin belirli bir oran veya miktarda yukarısına çıkılması diyabetin başladığının bir göstergesidir. Günümüze kadar yapılmış olan çeşitli çalışmalarda tip 1 diyabetin deneysel olarak farklı metotlarla oluşturulabildiği gösterilmiştir. Tip 1 diyabet oluşturma protokollerinin her birinin kendi içerisinde hem avantajları hem de dezavantajları bulunmaktadır. Her protokolün sonuçlanması farklı zaman aralığında ve çeşitli etkenlere bağlı olarak gerçekleşmektedir. Çalışmada kullanılacak hayvan sayısı, deneklerin sağlık ve beslenme durumları gibi çeşitli etmenlere bağlı olarak farklı protokoller seçilmektedir. Hem geliştirilen bu protokoller hem de tip 1 diyabet hastalığıyla ilgili artan bilgimiz sayesinde çeşitli transgenik hayvanların üretilmesi bir nebze bile olsa bu hastalığın aydınlatılması ve tip 1 diyabetin belirli yönlerine odaklanılması konusunda önemli gelişmelerin kaydedilmesini sağlamıştır. Bu derlemede farelerde güncel olarak kullanılan tip 1 diyabet oluşturma modellerinin bir araya getirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet Modelleri, Fare, Tip 1 Diyabet.

Experimental Models of Type 1 Diabetes Administered to Mice

Abstract: Diabetes is one of the crucial health problems in this decade. Insulin secreted by β cells in the pancreatic islets of Langerhans plays a critical role in regulating the blood glucose level. Type 1 diabetes occurs as a consequence of damage to these cells or inhibition of insulin secretion in a distinctive way. Experimental type 1 diabetes can also be developed in animal species due to beta cell damage. Each animal species has specific blood glucose levels. Increasing this level at a certain rate or amount is an indication of the onset of diabetes. In various studies conducted to date, it has been demonstrated that type 1 diabetes can be established experimentally by different methods. Each type 1 diabetes management protocol has its advantages and disadvantages. The results of each protocol take place at different time intervals and depending on various factors. Different protocols are established considering various factors such as the number of animals to be used in the study and the health and nutritional status of experimental animals. Thanks to both these protocols developed and our increasing knowledge of type 1 diabetes, the production of various transgenic animals has led to significant advances in elucidating this disease and focusing on specific aspects of type 1 diabetes mellitus. This review aimed to bring together currently used type 1 diabetes models in mice.

Keywords: Diabetes Models, Mouse, Type 1 Diabetes.

✉Semin GEDİKLİ

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: semin.gedikli@atauni.edu.tr

GİRİŞ

Diyabet hastalığı vücutta insülin hormonunun yeteri kadar üretilmemesi ya da yeterli miktarda olmasına rağmen beklenen etkiyi gösterememesi sonucunda ortaya çıkan, dünyada görülme sıklığı her geçen gün artan, tedavi edilmez ya da koruyucu önlemler alınmazsa ciddi komplikasyonlarla sonuçlanabilen kronik bir hastalıktır. Dünyada 2019 yılı itibariyle 463 milyon diyabetli insan olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 2045 yılı itibariyle %51'lik artışla 700 milyon insanın diyabet hastalığına yakalanacağı da tahmin edilmektedir (Canbolat ve ark., 2022). Diyabet hastalığının tip 1 (T1D) ve tip 2 (T2D) diyabet olmak üzere 2 ana formu bulunmakla beraber son zamanlarda yapılan bir çalışma ile aslında 5 çeşit diyabet türü olduğu belirlenmiştir (Pathak ve ark., 2019).

Tip 1 diyabet, en güçlü otoimmün hastalıklardan biridir ve her yıl milyonlarca insanın bu hastalıkla mücadele ettiği bilinmektedir (Gao ve ark., 2021). Tip 1 diyabet pankreasta bulunan, insülin üretmekle görevli olan β hücrelerinin T hücreleri tarafından yıkılanması sonucu %70-90 oranında otoantikörlerin oluşmasıyla meydana gelen otoimmün bir hastalıktır. Juvenil başlangıçlı veya insüline bağımlı diyabet olarak da adlandırılan tip 1 diyabet, tedavi edilmediği takdirde hiperglisemi ile sonuçlanmaktadır (Burn, 2010; Katsarou ve ark., 2017). Bununla birlikte hastalığın başlamasına neden olan mekanizmalar henüz tam anlamıyla bilinmemektedir (Yossipof ve ark., 2019). Tüm diyabet vakalarının yalnızca %5 ile %10'unu oluşturmasına rağmen tip 1 diyabet diğer diyabet tiplerinden daha erken yaşlarda başlaması, gerek uzun gerek kısa vadeli sonuçlarının ciddi sorunlara yol açmasıyla her zaman gündemde kalan kronik bir hastalıktır (Daneman, 2006).

Tip 1 diyabetin dolaşımında kan şekeri seviyesinde artış, yüksek kardiyovasküler hastalık riski, artan kan basıncı ve böbrek yetmezliği gibi pek çok komorbiditeye yol açtığı bilinmektedir (Schiazza ve ark., 2021). Diyabetin nöroinflamasyon sonucunda

hipokampusta sinaptik bozukluklara dahi neden olabileceği gösterilmiştir (Han ve ark., 2019). Ayrıca tip 1 diyabetin kemiklerde mineral yoğunluğunun azalmasına ve dolayısıyla kemik kırılma riskine neden olduğu da yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (Hu ve ark., 2021; Ozgurel ve ark., 2022). Bunlara ek olarak diyabet hastalığı, deri bariyerini bozarak ve deriyi kurutarak bulaşıcı hastalıkların organizmaya girişini de kolaylaştırmaktadır (Horikawa ve ark., 2021).

Tip 1 diyabet patogenezinin anlaşılması hususunda son yirmi yılda büyük ölçüde gelişmeler kaydedilmiş olsa da hastalığın tedavisi konusundaki gelişmeler hala oldukça sınırlıdır (Huo ve ark., 2021). Tip 1 diyabetin genellikle çocuklarda ve ergen bireylerde ortaya çıktığı bilgisi artık rafa kaldırılmıştır ve tip 1 diyabetin meydana gelmesinde yaşın bir etken olmadığı yapılan bir çalışma ile gösterilmiştir (Leslie, 2010). Tip 1 diyabet oluşumunun temelinde genetik yatkınlığın ve çevresel etmenlerin olduğu da bir gerçektir (Atkinson & Eisenbarth, 2001; Siljander ve ark., 2019). Tip 1 diyabetin insidansı, genetik değişikliklerin açıklayabileceğinden daha hızlı bir biçimde artmaktadır (Jia ve ark., 2020).

Tip 1 diyabetin 1A ve 1B olmak üzere iki farklı çeşidi bulunmaktadır. Tip 1A diyabette pankreastaki Langerhans adacıklarında bulunan β hücreleri yıkılanırken diğer hücreler (örneğin; glukagon üreten α hücreleri) bu yıkılanmaya dahil olmayıp herhangi bir zarar görmemektedir. Tip 1A diyabette genelde şiddetli düzeyde ve sürekli olarak meydana gelen bir insülin yetersizliği mevcuttur. Ayrıca tip 1A diyabetin insan lökosit antijeni (HLA) allelleri ile kuvvetli derecede ilişkisi olduğu da bilinmektedir. Öte yandan tip 1B diyabette β hücrelerinin immün sistem tarafından yıkıldığı tespit edilememiş, fakat tip 1A ile benzer şekilde şiddetli insülin yetersizliğinin görüldüğü bir tür olduğu belirlenmiştir (Eisenbarth, 2005). Diyabetli olmayan sağlıklı bir farenin 4-6 saat açlıktan sonraki kan glikoz seviyesinin 80-100 mg/dL olduğu bilinmektedir (Fontaine, 2019). Farelere kan şekeri düzeyinin 250 mg/dL üzerine çıkması diyabet varlığının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Klueh ve ark., 2006). 600-620 gram ağırlığında olan

sıçanlarda kan glikoz düzeyinin 109.1 ± 14.1 mg/dL aralığında seyrettiğinin bilinmesine ek olarak 900-1200 gram aralığındaki tavşanların kan glikoz düzeyinin 96 ± 6.8 mg/dL ve 125-135 gram aralığındaki pikalarda kan glikoz düzeyinin 95 ± 7.2 mg/dL seviyelerinde olduğu gösterilmiştir (Kosaka ve ark., 1999).

Farelerde Tip 1 Diyabet İndüksiyon Yöntemleri

1) Anti-İnsülin Serum Kullanılarak Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

Hiperglisemi insülinin akut olarak eksikliğinde meydana gelen bir semptomdur. Genelde gine domuzlarından elde edilen anti-insülin serum kullanılması, hipergliseminin oluşması için tercih edilen bir yöntemdir (Robinson & Wright, 1961). Bu prosedürün kullanımında insülin-antikör reaksiyonlarının incelenmesi için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Gine domuzundan elde edilen anti-insülin serumunun üretimi ve kullanımına ilişkin çeşitli çalışmalar yapılmıştır (Wright & Malaisse, 1966). Anti-insülin serumunun kullanımı sonucunda pankreasta bulunan hücrelerin bu serumdan etkilenmemesine rağmen kanda bulunan insülin hormonu bu serum vasıtasıyla inhibe edilerek hipoinsülinemi oluşmaktadır. İnsülin yetersizliğinden dolayı meydana gelen hiperglisemi kısa süreli olsa da bu metot yine de kullanılmaktadır (Akca & Çeltik, 2013).

2) Cerrahi Yöntemle Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli (Pankreatektomi)

Tip 1 diyabet sadece kimyasal ajanlara maruz kalma yoluyla oluşturulmayıp cerrahi yöntemler kullanılarak da oluşturulabilmektedir. Pankreatektomi, pankreastaki Langerhans adacıklarında bulunan β hücrelerinin hasarı sonucu oluşan tip 1 diyabeti hızlı bir şekilde ortaya çıkarmak üzere pankreasın bir kısmının ya da tamamının alınması esasına dayanılarak gerçekleştirilen bir yöntemdir. İlk kez Victor Jörgens Oskar Minkowski tarafından uygulanan bu yöntemde sadece pankreasta bulunan insülin hormonu salgılamakla

görevli olan hücreler değil diğer hücrelerin de yok olması sebebiyle çeşitli hormonal dengesizlikler meydana geleceğinden normal tip 1 diyabetten mustarip bir hastadan daha farklı durumlar meydana gelmektedir (Jörgens, 2006; Niwano ve ark., 2018).

3) Kimyasal Ajanlar Kullanılarak Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

a) Alloksan Kullanılarak Tip 1 Diyabet Oluşturma

Alloksanın Langerhans adacıklarındaki β hücrelerine spesifik olarak zarar verebildiği 1943 yılında Dunn ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir (Dunn ve ark., 1943). β hücrelerine verdiği zarar ile tip 1 diyabetin oluşmasını sağlayan alloksan toksisitesinin tam olarak mekanizması anlaşılamamıştır. Fakat yapılan çeşitli çalışmalarda alloksan uygulamasının ardından plazma zarının mannitol ve inulin-C gibi ekstrasellüler belirteçlere karşı geçirgenliğinin arttığı belirlenmiştir (Watkins ve ark., 1964). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada horseradish peroksidazın membran üzerine geçirgenliğinin alloksan uygulaması sonucunda arttığı tespit edilmiştir (Tomita & Watanabe, 1976). Ayrıca alloksanın pankreas adacıklarından D-glikoz ile uyarılan insülin salınımını engellediği de bildirilmiştir (Tomita ve ark., 1974). β hücrelerinin fonksiyonlarını düzgün bir biçimde yerine getirebilmesi için heksokinaz, protein kinaz, sülfidril ve glukokinaz gibi enzimlere ihtiyaç duyduğu bilinmektedir. Bu enzimler alloksan varlığında inhibe olmaktadır. Özellikle alloksan varlığında bu inhibisyona daha duyarlı olan glukokinazın sülfidril gruplarının etkilenmesi ile Langerhans adacıklarındaki β hücreleri toksikasyona uğramakta ve bu nedenle insülin üretimi bloklanmaktadır. Alloksanın enzim inhibisyonunun yanı sıra mitokondriyal transport sistemi üzerinde de etkisi olduğu ve bu sistemi inhibe ederek hücre ölümünü gerçekleştirdiği bilinmektedir. Ek olarak serbest radikaller üzerinde hasar oluşturabilmesi de

alloksanın etki mekanizmaları arasında yer almaktadır (İrer & Alper, 2004).

Alloksanın kimyasal özelliklerinden dolayı seçici bir şekilde sadece β hücrelerinde hızlı bir şekilde birikerek toksik etkisini spesifik olarak göstermesi, deney hayvanlarında diyabet oluşturmak için bu kimyasalın tercih edilme durumunu artırmaktadır (Akca & Çeltik, 2013). Alloksan farklı şekillerde uygulansa da biyoyararlanımını maksimum düzeyde tutmak için en etkili uygulama şekli intravenöz enjeksiyondur. Diyabet oluşturmak için kullanılan doz çeşitli etmenlere göre değişiklik göstermekle beraber çoğunlukla çalışmalarda ortalama 40-45 mg/kg oranında kullanıldığı görülmektedir. Alloksanın farklı hayvan türlerinde diyabet oluşturabilme kapasitesi mevcuttur (Bell Jr & Hye, 1983).

b) Streptozotosin Kullanılarak Tip 1 Diyabet Oluşturma

Toprağa yerleşen *Streptomyces achromogenes*'in bir metaboliti olan streptozotosinin keşfi 1959 yılında Vavra ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (Vavra ve ark., 1959). Yapılan bir çalışmada streptozotosinin intravenöz uygulama sonrası diyabete yol açtığı keşfedilmiştir. Streptozotosinin histolojik incelemelerle de kanıtlanan diyabet yapıcı etkisini β hücrelerini nekroza uğratmadan sadece insülin salgısını inhibe etmek yoluyla gerçekleştirdiği öne sürülmektedir. Ayrıca Arison ve arkadaşları elektron mikroskobu ile streptozotosin uygulaması sonrası β hücrelerini izlemiş ve streptozotosinin β hücrelerini nekroza uğratmadığını ancak etkisini β hücrelerini degranülasyona uğratmak suretiyle gerçekleştirdiğini tespit etmişlerdir (Arison ve ark., 1967).

Streptozotosin, yapısında bulunan glikoz molekülü sayesinde plazma membranında bulunan glukoreseptörlere bağlanarak insülin salgısını inhibe eder. β hücrelerinin plazma membranına olan etkisinin dışında streptozotosinin hücre içi nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) seviyesini aşağıya çektiği düşünülmekle beraber bu durum hala

kesinliğe kavuşturulamamıştır. Haliyle streptozotosin ile oluşturulan diyabet modellerinin bloklanması NAD tedavisi ile sağlanmaktadır (Bell Jr ve Hye, 1983). Streptozotosin kullanılarak farelerde diyabet oluşturabilmek için çeşitli protokoller bulunmaktadır. İlk protokolde düşük dozlarda fakat tekrarlı olarak streptozotosin uygulanmaktadır. Bu sayede Langerhans adacıkları daha az zarar görmekte ancak β hücrelerinin aktivite kaybı daha fazla olmaktadır. Yaygın olarak tip 1 diyabet indüksiyonu için kullanılan bu yöntem 5 gün boyunca streptozotosinin 40 mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmasını temel almaktadır. Streptozotosin kullanılarak oluşturulan bir diğer diyabet modeli ise tek sefere mahsus yüksek doz streptozotosin uygulamasını içermektedir. Yüksek doz ile verilen streptozotosin sayesinde 48 saat içerisinde diyabet modeli oluşmaktadır ancak bu dozun pankreastaki β hücreleri için yüksek düzeyde toksik olduğu da göz ardı edilmemelidir. Kan şekerini 500 mg/dl düzeylerinin de yukarısına çıkarabilen bu protokol çoklu streptozotosin dozundan daha toksik olmasına rağmen tek enjeksiyonda istenilen sonuca ulaşmasından dolayı hala çok tercih edilmektedir. Diyabetik ajanların değerlendirilmesi ve tip 1 diyabetin patogenezinin incelenmesi amacıyla streptozotosinin 65 mg/kg intraperitoneal olarak uygulandığı da ayrıca belirtilmektedir. Kullanılan bir diğer protokolde ise streptozotosin uygulamasının yanında eş zamanlı olarak nikotinamid de verilmektedir. Nikotinamid kısmen streptozotosin toksisitesine karşı koruma sağlamaktadır. Bu protokol, β hücrelerinin fonksiyonunun yaklaşık olarak %60 oranında kaybına ek olarak daha stabil ve orta düzeyde bir hiperglisemi oluşturmaktadır (Furman, 2015).

Alloksan ve streptozotosin ile oluşturulan diyabet modelleri arasında çeşitli farklar bulunmaktadır. Örneğin alloksan ile sağlanan diyabet modelinde kan glikoz düzeyi daha yüksek seviyelere çıkabilmektedir. Öte yandan alloksan ile oluşturulan modellerde trifazik yanıtın streptozotosin ile oluşturulan modellere göre 1 saat daha erken olduğu bilinmektedir. Streptozotosin vasıtasıyla oluşturulan

diyabet modeli devamında ketozisle karşılaşma oranı daha düşüktür. Tip 1 diyabet modelleri uygulanırken nöropati oluşabilmektedir. Alloksan protokolü kullanılırken görülen nöropatiler daha hafif seyrederken streptozotosin ile oluşturulan diyabet protokollerinde bu durumun tersi şekillenmektedir. Kimyasal ajanlarla oluşturulan diyabet modelleri sonrasında vücut eski fizyolojisine dönmek için Langerhans adacıklarını iyileştirmeye çalışmaktadır. Protokol uygulandıktan birkaç ay sonra meydana gelen bu yenilenme olayı sonucunda Langerhans hücrelerinde adenomlar oluşabilmekte ve bu durum kan şekerinin normal seviyenin de altına düşmesine neden olabilmektedir. Alloksan ile oluşturulan modellerde diğer modele göre adenom riskinin daha az olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla eğer çalışma prosedürü uzun zaman aralıklarına yayılacak ve akut semptomlardan ziyade kronikleşen durumlar incelenecekse streptozotosin kullanımı ve beraberinde getireceği dezavantajlar göz önünde bulundurulmalıdır (İrer & Alper, 2004).

c) Ferrik Nitrotriasetat Kullanılarak Tip 1 Diyabet Oluşturma

Nadir olarak tercih edilen bu yöntemde protokol 60 güne yayılmaktadır. Ferrik nitrotriasetatın 60 gün boyunca uygulanmasından sonra hiperglisemi, glikozüri, ketonemi ve ketonüri gibi semptomlarla karşılaşıldığı bildirilmektedir. Karaciğerde ve pankreasta ağır demir birikimi de bu protokol sonucu görülebilmektedir. Ferrik nitrotriasetatın 2 ay boyunca verilmesi ile bu metot uygulanmaktadır (Etuk, 2010).

4) Virüsler Kullanılarak Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

Diyabet yukarıda belirtilen modellerden farklı olarak virüsler vasıtasıyla da oluşturulabilmektedir. Picarno virüs ailesinin bir üyesi olan ensefalomiyokardit virüsünün M varyantının, fareler üzerinde tip 1 diyabet oluşturabilme özelliği vardır.

Virüsün fareye verilmesinin ardından %40 oranında gelişen pankreatik insülinitis, devamında ölüme kadar götürebilen ketozise, hiperglisemiye ve glikoz toleransında bozukluklara yol açmaktadır. Ensefalomiyokardit virüsünün yanı sıra kilham rat virüsünün de sıçanlar üzerinde otoimmün kaynaklı diyabet oluşturabildiği bilinmektedir. Enterovirüsler hakkında daha detaylı çalışmalar yapılmış olsa da rotavirüs enfeksiyonunun da tip 1 diyabet gelişimi üzerindeki potansiyel etkileri üzerine araştırmalar yapılmıştır. Reovirus, Coxsachie B, Sitomegalovirus, Rubella ve Venezuelen Equine Ensefalit virüslerinin de tip 1 diyabet oluşturmada kullanılabileceği düşünülmektedir (Burke ve ark., 2020; İrer & Alper, 2004; Jun & Yoon, 2001).

5) Spontan Diyabet Sendrom Modelleri

a) Obez Olmayan Diyabetik Farelere ile Tip 1 Diyabet Modeli

Obez olmayan diyabetik fare, insan tip 1 diyabetini anlamak için yaygın olarak kullanılan bir hayvan modelidir (Tian ve ark., 2019). Bu tür diyabet, farelerde doğuştan gelen, herhangi bir dış etki bulunmadan ortaya çıkan tip 1 diyabet türüdür. Bu farelerde diyabetin gelişiminde etkili olan en az 20 adet lokusun bulunduğu bilinmektedir (Koarada ve ark., 2004). Bu tip farelerin pankreaslarından elde edilen T hücrelerinin insüline karşı reaktif olduğu bildirilmiştir (Wegmann & Eisenbarth, 2000). Genelde 12. haftadan itibaren hiperglisemi semptomlarını gösteren bu farelerde uzun vadeli olarak tip 1 diyabetin getirdiği komplikasyonların incelenmesi mümkün olmakta ve uzun vadeli diyabet etkileri üzerinde testler yapılabilmektedir (Etuk, 2010). Antijene özgü tolerans, obez olmayan diyabetik farelerde tip 1 diyabeti önlemektedir, ancak insanlarda bu durumun daha az etkili olduğu kanıtlanmıştır. Birkaç oto-antijen, hastalık gelişimi için temeldir, bu da tip 1 diyabet etiolojisinin heterojen olduğunu ve antijene özgü tedavilerin etkinliğini farklı hastalık endotipleriyle

sınırlayabileceğini düşündürmektedir (Nelson ve ark., 2020).

b) Bio Breeding Fareler ile Tip 1 Diyabet Modeli

Keşfedildiği laboratuvarından ismini alan bu modelde, obez olmayan diyabetik fareler ile oluşturulan modelde olduğu gibi yavruların kendi aralarında üremesi gerçekleştirilerek ırkın saflığını koruması sağlanmıştır. İnsanda tip 1 diyabet sonucu görülen semptomlarla paralel bir şekilde ilerleyen bu modelde puberte döneminde poliüri, polidipsi semptomlarına ek olarak kilo kaybı da bulunmaktadır. Glutamik asit dekarboksilaz diyabetin gelişimi ile ilişkili bir enzimdir. Bu modelde β hücrelerinden salgılanan glutamik asit dekarboksilaza karşı antikor bulunduğu bilinmektedir. Bu modelin oluşum mekanizması her ne kadar obez olmayan diyabetik fareler ile oluşturulan model ile aynı olsa da diyabet kaynağının gastrointestinal sistem kaynaklı olduğu yani bağırsaklarda bir fonksiyon kaybı sonucu ortaya çıktığı bildirilmiştir. Her gün insülin enjeksiyonu yapılmasının gerekmesi, ketoasidoza girme eğilimleri, mikoplazmaya ve solunum yolu enfeksiyonlarına karşı savunma sistemlerinin zayıf olması nedeniyle bakımlarının zorluğuna rağmen yine de bu modelde çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu modelde kullanılan deney hayvanlarının immün sistemi baskılayıcı ilaçlarla tedavi edilebileceği de gün ışığına çıkarılmıştır (Akca & Çeltik, 2013; Bone ve ark., 1990; İrer & Alper, 2004).

6) Glikoz Yükleme Yapılarak Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

Şeker hastalığının fizyolojik olarak indüksiyonu şeklinde de adlandırılan bu yöntem esasında pankreasa zarar vermeden tip 1 diyabet modeli oluşturmayı hedeflemektedir. Bu model geçici olarak bir diyabet oluşturmaktadır. İnsanlarda diyabet eşliğinde olan hastaların teşhisinde de kullanılan bu model klinik ortamda glikoz tolerans testi olarak da bilinmektedir. Bu metot gece boyunca aç bırakılan hayvanlara uygulanmakta ve aç bırakılma süresinin sonunda oral olarak 1-2,5 g/kg glikoz yüklemesi

yapılmaktadır. Yükleme yapıldıktan sonra kanda bulunan glikoz seviyesi monitorize edilmektedir. Bu prosedürün genellikle tavşan ve sıçanlarda kullanıldığı bildirilmektedir. Farklı indüksiyon yöntemleri ile karşılaştırıldığında bu yöntemin ciddi düzeyde dalgalı bir hiperglisemi düzeyi oluşturduğu da ayrıca bilinmektedir (Etuk, 2010).

7) Transgenik Fareler ile Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modelleri

a) T Hücre Reseptörü Transgenik Fareler ile Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

Obez olmayan diyabetik farelerde diyabetojenik T hücrelerinin klonları bulunmaktadır. Bu klonların T hücrelerinde bulunan reseptörlerinin bugüne kadar 3'ü kullanılarak transgenik fareler üretilmiştir. Otoreaktif T hücrelerinin aktivasyonu ve göçü gibi gizemini koruyan soruların cevabına bu tip fareler kullanılarak oluşturulan modeller sayesinde ulaşılabilmektedir (Wong ve ark., 1999).

b) Çift Transgenik Model Fareler ile Oluşturulan Tip 1 Diyabet Modeli

Çift transgenik model, pankreasta bulunan β hücreleri üzerinde X antijeninin transgenik ekspresyonu ile bu X antijeni için spesifik bir transgenik T hücre reseptörünün kombine olması durumunda bir insülin promotörü aracılığıyla karakterize edilen bir modeldir. Kullanılan bu farelerde tip 1 diyabet 10. haftadan itibaren gelişmektedir. Obez olmayan diyabetik fareler ile oluşturulan model ile karşılaştırılınca bu model daha kısa sürede inceleme yapmaya imkan tanımaktadır (Van Belle ve ark., 2009).

SONUÇ

Diyabet hastalığı tüm mekanizmalarının hala aydınlatılmaması ve hakkında pek çok soru işaretinin olması nedeniyle bilim insanlarının ilgisini çekmekte ve üzerinde sayısız çalışmalar yapılmaktadır. Deneysel olarak diyabet hastalığının oluşturulması için farklı yöntemler geliştirilmiş ve bu yöntemler özellikle prelinik çalışmalarda

kullanılmıştır. Her yöntemin kendi içerisinde var olan avantajları ve dezavantajları aydınlatılmak istenilen spesifik alan göz önünde bulundurularak seçilmeli ve çalışmanın stratejisi bu yönde belirlenmelidir. İnsülinin keşfi öncesi çaresiz bir hastalık olarak görülen diyabet hastalığının tedavisinde, bilimin ilerlemesi, çeşitli modellerin ve doğuştan diyabetli hayvanların üretilmeye başlanması ve bunlara ek olarak diyabet teknolojilerindeki yeni gelişmelerin yaşanmasıyla birlikte artık daha umut verici sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Sonuç olarak beşerî ya da veteriner hekimliğin gelişimi için tasarlanan çalışmalarda, çeşitli yöntemlerle deneysel tip 1 diyabet oluşturulabileceği bu derleme ile daha iyi anlaşılmaktadır. Bu derleme, bir çalışma planlanırken tek bir modele bağlı kalınmaması gerektiğini, farklı yöntemlerle de tip 1 diyabetin oluşturulabileceğini ve deneysel tip 1 diyabet protokollerinin kendi içlerinde var olan avantaj ve dezavantajlarını ortaya koymaktadır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

1. Akça M., Çeltik MN, 2013. Kemirgenlerde Diabetes Mellitus Modelleri. *Gr. Anal.* 28, 104–105.
2. Arison RN, Ciaccio EI, Glitzer MS, Cassaro JA, Pruss MP, 1967. Light and electron microscopy of lesions in rats rendered diabetic with streptozotocin. *Diabetes.* Jan;16(1):51-6.
3. Atkinson MA, Eisenbarth GS, 2001. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet.* Jul 21;358(9277):221-9.
4. Bell RH Jr, Hye RJ, 1983. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology. *J Surg Res.* Nov;35(5):433-60.
5. Bone AJ, Walker R, Varey AM, Cooke A, Baird JD, 1990. Effect of cyclosporin on pancreatic events and development of diabetes in BB/Edinburgh rats. *Diabetes.* Apr;39(4):508-14.
6. Burke RM, Tate JE, Jiang B, Parashar UD, 2020. Rotavirus and Type 1 Diabetes-Is There a Connection? A Synthesis of the Evidence. *J Infect Dis.* Sep 1;222(7):1076-1083.
7. Burn P., 2010. Type 1 diabetes. *Nature reviews Drug discovery,* 9(3), 187.
8. Canbolat Ö., Ekenler Ş., Polat Ü. (2022). Diyabet Özyönetiminde Engeller ve Kolaylaştırıcılar. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi,* 29(1), 143-148.
9. Daneman D., 2006. Type 1 diabetes. *The Lancet,* 367(9513), 847-858.
10. Dunn JS., Kirkpatrick J., McLetchie N., Telfer S., 1943. Necrosis of the islets of Langerhans produced experimentally. *Journal of Pathology and Bacteriology,* 55, 245-257.
11. Eisenbarth GS., 2005. Type 1 diabetes mellitus. *Joslin's diabetes mellitus,* 14, 399-424.
12. Etuk E., 2010. Animals models for studying diabetes mellitus. *Agric Biol JN Am,* 1(2), 130-134.
13. Fontaine D., 2019. 5 Common Questions for Diabetic Models.
14. Furman BL., 2015. Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Current protocols in pharmacology,* 70(1), 5.47. 41-45.47. 20.
15. Gao S., Li Y., Xiao D., Zhou M., Cai X., Lin Y., 2021. Tetrahedral framework nucleic acids induce immune tolerance and prevent the onset of type 1 diabetes. *Nano letters,* 21(10), 4437-4446.
16. Han R, Liu Z, Sun N, Liu S, Li L, Shen Y, Xiu J, Xu Q., 2019. BDNF Alleviates Neuroinflammation in the Hippocampus of Type 1 Diabetic Mice via Blocking the Aberrant HMGB1/RAGE/NF-κB Pathway. *Aging Dis.* Jun 1;10(3):611-625.
17. Horikawa T, Hiramoto K, Goto K, Sekijima H, Ooi K., 2021. Differences in the mechanism of type 1 and type 2 diabetes-induced skin dryness by using model mice. *Int J Med Sci.* Jan 1;18(2):474-481.
18. Hu XF, Xiang G, Wang TJ, Ma YB, Zhang Y, Yan YB, Zhao X, Wu ZX, Feng YF, Lei W., 2021. Impairment of type H vessels by NOX2-mediated

- endothelial oxidative stress: critical mechanisms and therapeutic targets for bone fragility in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Theranostics*. Jan 30;11(8):3796-3812.
19. Huo Y., Zhao X., Zhao J., Kong X., Li L., Yuan T., Xu J., 2021. Hypoglycemic effects of Fu-Pen-Zi (*Rubus chingii* Hu) fruit extracts in streptozotocin-induced type 1 diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 87, 104837.
 20. İrer SV., Alper G., 2004. Experimental models of diabetes mellitus. *Türk Klinik Biyokimya Derg*, 2(3), 127-136.
 21. Jia L, Cao M, Chen H, Zhang M, Dong X, Ren Z, Sun J, Pan LL., 2020. Butyrate Ameliorates Antibiotic-Driven Type 1 Diabetes in the Female Offspring of Nonobese Diabetic Mice. *J Agric Food Chem*. Mar 11;68(10):3112-3120.
 22. Jörgens V., 2006. Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. *Hormones (Athens)*. Oct-Dec;5(4):310-1.
 23. Jun HS, Yoon JW., 2001. The role of viruses in type I diabetes: two distinct cellular and molecular pathogenic mechanisms of virus-induced diabetes in animals. *Diabetologia*. Mar;44(3):271-85.
 24. Katsarou A., Gudbjörnsdóttir S., Rawshani A., Dabelea D., Bonifacio E., Anderson BJ., Lernmark Å., 2017. Type 1 diabetes mellitus. *Nature reviews Disease primers*, 3(1), 1-17.
 25. Klueh U, Liu Z, Cho B, Ouyang T, Feldman B, Henning TP, Kaur M, Kreutzer D., 2006. Continuous glucose monitoring in normal mice and mice with prediabetes and diabetes. *Diabetes Technol Ther*. Jun;8(3):402-12.
 26. Koarada S, Wu Y, Fertig N, Sass DA, Nalesnik M, Todd JA, Lyons PA, Fenyk-Melody J, Rainbow DB, Wicker LS, Peterson LB, Ridgway WM., 2004. Genetic control of autoimmunity: protection from diabetes, but spontaneous autoimmune biliary disease in a nonobese diabetic congenic strain. *J Immunol*. Aug 15;173(4):2315-23.
 27. Kosaka M., Yang G., Piad JN., Lee JB., Cao Y., Yamauchi M., Sakai A., 1999. Thermobiological characteristics of pikas, rabbits and rats. *熱帯医学 Tropical medicine*, 40(3), 157-163.
 28. Leslie RD., 2010. Predicting adult-onset autoimmune diabetes: clarity from complexity. *Diabetes*. Feb;59(2):330-1.
 29. Nelson AS, Maddaloni M, Abbott JR, Hoffman C, Akgul A, Ohland C, Gharaibeh RZ, Jobin C, Brusko TM, Pascual DW., 2020. Oral therapy with colonization factor antigen I prevents development of type 1 diabetes in Non-obese Diabetic mice. *Sci Rep*. Apr 9;10(1):6156.
 30. Niwano F, Hiromine Y, Noso S, Babaya N, Ito H, Yasutake S, Matsumoto I, Takeyama Y, Kawabata Y, Ikegami H., 2018. Insulin deficiency with and without glucagon: A comparative study between total pancreatectomy and type 1 diabetes. *J Diabetes Investig*. Sep;9(5):1084-1090.
 31. Pathak V, Pathak NM, O'Neill CL, Guduric-Fuchs J, Medina RJ., 2019. Therapies for Type 1 Diabetes: Current Scenario and Future Perspectives. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes*. May 3;12:1179551419844521.
 32. Robinson B., Wright P., 1961. Guinea-pig anti-insulin serum. *The Journal of Physiology*, 155(2), 302.
 33. Schiazza AR, Considine EG, Betcher M, Shepard BD, 2021. Loss of renal olfactory receptor 1393 leads to improved glucose homeostasis in a type 1 diabetic mouse model. *Physiol Rep*. Dec;9(23):e15007.
 34. Siljander H, Honkanen J, Knip M., 2019. Microbiome and type 1 diabetes. *EBioMedicine*. Aug;46:512-521.
 35. Tian X, Lin Y, Cui C, Su M, Lai L., 2019. BTNL2-Ig Protein Attenuates Type 1 Diabetes in Non-Obese Diabetic (NOD) Mice. *Adv Healthc Mater*. May;8(9):e1800987.
 36. Tomita T, Lacy PE, Natschinsky FM, McDaniel ML., 1974. Effect of alloxan on insulin secretion in isolated rat islets perfused in vitro. *Diabetes*. Jun;23(6):517-24.
 37. Tomita T, Watanabe I., 1976. The effect of alloxan on the permeability of isolated

- pancreatic islets to horseradish peroxidase. *Virchows Arch B Cell Pathol.* Nov 24;22(3):217-32.
38. Ucer Ozgurel S, Swallow EA, Metzger CE, Allen MR., 2022. Femoral Skeletal Perfusion is Reduced in Male Mice with Type 1 Diabetes. *Calcif Tissue Int. Sep;*111(3):323-330.
39. Van Belle T, Taylor P, Von Herrath M., 2009. Mouse models for type 1 diabetes. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 6(2), 41-45.
40. Vavra J, Deboer C, Dietz A, Hanka L, Sokolski W., 1959. Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiotics annual*, 7, 230-235.
41. Watkins D, Cooperstein S, Lazarow A., 1964. Effect of alloxan on permeability of pancreatic islet tissue in vitro. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 207(2), 436-440.
42. Wegmann DR., Eisenbarth GS., 2000. It's insulin. *Journal of autoimmunity (Print)*, 15(3), 286-291.
43. Wong FS, Dittel BN, Janeway CA Jr., 1999. Transgenes and knockout mutations in animal models of type 1 diabetes and multiple sclerosis. *Immunol Rev. Jun;*169:93-104.
44. Wright PH, Malaisse WJ., 1966. A simple method for the assay of guinea pig anti-insulin serum. *Diabetologia.* Nov;2(3):178-88.
45. Yossipof TE, Bazak ZR, Kenigsbuch-Sredni D, Caspi RR, Kalechman Y, Sredni B., 2019. Tellurium Compounds Prevent and Reverse Type-1 Diabetes in NOD Mice by Modulating $\alpha 4\beta 7$ Integrin Activity, IL-1 β , and T Regulatory Cells. *Front Immunol.* 2019 May 29;10:979.



Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması

Ali Doğan ÖMÜR^{1a}, Serkan Ali AKARSU^{1b}✉

1. Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, Türkiye

ORCID: 0000-0002-2976-4368^{1a}, 0000-0003-4450-6540^{1b}

Geliş Tarihi/Received	Kabul Tarihi/Accepted	Yayın Tarihi/Published
24.08.2022	13.09.2022	28.09.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Ömür AD, Akarsu SA: Tavşanlarda Spermanın Alınması, İşlenmesi ve Saklanması. Lab Hayv Bil & Uyg Derg, 2(2): 105-110, 2022.

Öz: Tavşan gerek fiziksel özellikleri gerekse çalışma kolaylığı nedeniyle biyolojik araştırmaları için oldukça uygundur. Tavşanlardan ötenazi işlemine gerek kalmaksızın suni vajen yardımıyla sperma alınabilmesi sayesinde biyoteknolojik çalışmalar kolaylıkla yürütülmektedir. Tavşan spermasının işlenmesi ve saklanması; mevcut kirlilik, lipid peroksidasyona aşırı duyarlılık, dondurma çözündürme sonrası total ve progresif motilite değerlerinde düşüklük sebebiyle tecrübe gerektirmektedir. Benzer şekilde mevsim ve sperma alma sıklığı da sperma kalitesini etkilemektedir. Tavşanlarda suni vajen (SV) ve elektroejekülatör (EE) ile sperma alınması başlıca kullanılan yöntemlerdir. SV, anestezi gerektirmemesi ve elde edilen spermanın kalitesi bakımından EE'ye göre daha sık tercih edilmektedir. Tavşanlarda kullanılan en yaygın sperma sulandırıcısı TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) yumurta sarısı (%10-20) sulandırıcısıdır. Tavşan spermasının uzun süreli saklanmasında kullanılan kriyoprotektan maddeler spermanın kriyoprezervasyon başarısını etkileyebilmektedir. Bu amaçla, tavşanlarda sıklıkla dimetil sülfoksit (DMSO) ve amid türevleri kullanılmaktadır. Ayrıca tavşanlarda sperma hızlı ve yavaş yöntemler kullanılarak dondurulmaktadır. Bu alanda yapılan çalışmalar spermanın dondurulduktan sonra fertilizasyon yeteneğinin azaldığını göstermektedir. Bu yüzden tavşanlarda spermanın saklanması konusunda ileri düzey çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu derlemede tavşan spermasının kısa ve uzun süreli saklanmasındaki güncel gelişmeler hakkında bilgi vermesi amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, Kısa Süreli Saklama, Sperm Kriyoprezervasyonu, Tavşan.

Semen Collection, Processing and Storage in Rabbits

Abstract: The rabbit is quite suitable for biological research due to their physical properties and ease of working. Biotechnological studies are easily carried out thanks to the ability to collect semen from rabbits with the help of an artificial vagina without the need for euthanasia. The processing and storage of rabbit semen requires experience due to existing pollution, hypersensitivity to lipid peroxidation, and low total and progressive motility values after freezing and thawing. Similarly, the season and the frequency of semen collection also affect semen quality. The semen collection in rabbits with artificial vagina(AA) and electroejaculator(EE) are the main methods used. AV is preferred more often than EE in terms of not requiring anesthesia and the quality of the semen obtained. The most common semen extender used in rabbits is TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM citric acid, and 33.3 mM glucose) egg yolk (10-20%) extender. Cryoprotectant substances used in the long-term storage of rabbit semen affect the success of cryopreservation of semen. For this purpose, dimethyl sulfoxide (DMSO) and amide derivatives are frequently used in rabbits. Moreover, semen in rabbits is frozen using fast and slow methods. Studies show that the fertilization ability of semen decreases after freezing. Therefore, there is a need for advanced studies on the storage of semen in rabbits. In this review, it is aimed to give information about current developments in short and long-term storage of rabbit semen.

Keywords: Biotechnology, Rabbit, Semen Cryopreservation, Short-Term Storage.

✉Serkan Ali AKARSU

Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Erzurum, TÜRKİYE.
e-posta: serkanaliakarsu@gmail.com

GİRİŞ

Erkek tavşanlar, üreme alanında yapılan araştırmalarda fiziksel özellikleri ve çalışma kolaylığı açısından diğer laboratuvar hayvanlarına göre daha fazla tercih edilebilmektedir (Naughton ve ark., 2003). Yaş, besleme, sperma alınma sıklığı ve ışığa maruz kalma süresi gibi birtakım faktörler sperma kalitesini etkileyebilmektedir (Boiti ve ark., 2005). Erkek tavşanlar ad libitum olarak beslenmelidir (Luzı ve ark., 1996). İyi kalitede bir sperma elde edebilmek için diyetle ortalama %15 oranında protein bulunması gereklidir (Nizza ve ark., 2000). Spermada yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asidi (PUFA) bulunduğundan ve bu yağ asitleri membran akışkanlığını ve yeterliliğini modifiye ettiğinden, hayvanlara dengeli bir beslenme programının uygulanması önemlidir (Boiti ve ark., 2005). Tavşanlarda kaliteli bir ejakulat elde edilebilmesi için haftada bir kez sperma alınmalıdır (Bencheikh, 1995). Sperma, tavşanlarda suni vajen (SV) (Nizza ve ark. 2003) ve elektroejakulatör (EE) (Orihuela ve Ungerfeld 2019) yardımıyla alınabilmektedir. Işığa maruz kalma süresi de spermanın kalitesini etkileyebilmektedir. Günde 16 saat ışık, 8 saat karanlık ortamda tutulan tavşanlarda spermanın kalitesinin arttığı ve bunda hipotalamo-hipofiz aksının etkisinin olduğu düşünülmektedir (Theau-Clément ve ark., 1994). Yapılan bir çalışma, dondurma öncesinde spermadan seminal plazmanın elimine edilmesi dondurma-çözdürmeden sonra sperma kalitesinde bir iyileşme olduğunu da bildirmektedir (Gogol, 1999).

Tavşanlardan Sperma Alma Yöntemleri

Tavşanlarda kullanılan başlıca yöntemler; suni vajen ve elektroejakulatör yardımıyla sperma alma yöntemleridir.

Tavşanlarda suni vajenle sperma alma yönteminde uzunluğu yaklaşık olarak 8-12 cm, çapı ise 4-6 cm olan sert kauçuk ya da ebonitten yapılmış silindirik şeklinde bir ana gövde mevcuttur. Bu ana gövdeye yerleştirilen bir iç lastik ile suni vajene

takılan dereceli bir sperma toplama tüpünden oluşur. Diğer türler için tasarlanan suni vajenlerde olduğu gibi tavşanlar için üretilenlerde de taşınması gereken üç temel özellik; sıcaklık, basınç ve kayganlıktır (Şekil 1).



Şekil 1. Tavşan için üretilmiş suni vajen (Naughton, 2003)

Figure 1. Artificial vagina made for rabbits (Naughton, 2003)

Sperma alınabilmesi için erkek tavşanların önceden suni vajene alıştırmış olmaları gerekir. Genellikle erkek tavşanlar suni vajene birkaç denemeden sonra alışırlar. Seçilen uysal bir dişi tavşan, erkek tavşanın bulunduğu bir kafese bırakılır. Erkek tavşan dişiyi aşınca, dişinin arka iki bacağı arasına, sağ elle tutulan suni vajen yerleştirilir ve penisin suni vajene girmesi sağlanır (Şekil 2) (Sevinç, 1973).



Şekil 2. Suni vajenin tavşanda kullanımı (Naughton, 2003).

Figure 2. Use of artificial vagina in rabbit (Naughton, 2003).

Elektroejakülatör (EE), rektuma yerleştirilen bir elektrotla genital organları uyaran sinirlerin elektriksel uygulama ile uyarılması sonucu ereksiyonun ve ejakülasyonun sağlanmasıdır. Bu yöntemde; ilk olarak karboksi metilden üretilmiş 15 cm uzunluğunda, 0.8 cm çapında rektal prop anüse yerleştirilir. Periyodik bir şekilde 3-5 sn aralıklarla kontrollü olarak 0-15 V arası akım artırılarak uygulanır (Orihuela ve Ungerfeld 2019).

Tavşanlarda Sperma Muayenesi ve Referans Değerler

Tohumlama amacıyla kullanılacak tavşan spermasının değerlendirilmesi; genellikle alınan spermanın hacmi ve yoğunluğu ile bir yönde ve güçlü hareket eden spermatozoonların oranına bakılarak yapılır. Bu bakımdan, normal ve normalin üstünde sperma yoğunluğu ve güçlü bir spermatozoon hareket oranı gösteren ejakülatlar kullanılır. Düşük nitelikteki spermaların tohumlamada kullanılması tercih edilmez (Sevinç, 1973).

Spermatozoon üretimi, farklı tavşan ırklarında değişkenlik gösterebilmektedir. Yetişkin bir tavşanda spermatozoon yoğunluğu ortalama 250×10^6 'dır (El-Habbato ve ark. 1984). Spermatozoon olgunlaşması esnasında kanal sistemi aracılığıyla taşınan ve içeriğinde bol miktarda testis sıvı içeren spermanın yaklaşık olarak %40 kadarı epididimisin caput bölümünden emilmektedir (Orgebin-Crist, 1968). Epididimal geçiş toplamda 8-9 gün sürmekte olup, bu sürenin 2 günü caputta, 2 günü corpusta ve geri kalanı da caudada geçmektedir (Alvarino, 2000). Ayrıca spermatozoonların fertilizasyondan önce en az 4-6 saat süreyle uterusu kapasitasyon sürecini geçirmeleri gerekmektedir. Olgun spermatozoonların uterusuaki yaşam süresi ve fertil ömrü 24-36 saat arasında değişmektedir (Tablo 1) (İleri ve ark., 2002).

Tablo 1. Orta büyüklükteki bir erkek tavşanda ortalama sperma verimi (İleri ve ark., 2002).

Table 1. Average semen yield in a medium-sized male rabbit (İleri ve ark., 2002).

Ejakülat Hacmi (ml)	0.32-6 (ort: 0.5-1)
Jel Miktarı (gr) / ejakülat	1.7
Spermatozoa Sayısı / ml	$10-1000 \times 10^6$ (ort: 700×10^6)
Spermatozoa Sayısı / ejakülat	$150-200 \times 10^6$
Spermatozoa Sayısı / testis	350×10^6
Spermatozoa Sayısı / gün	$88-170 \times 10^6$
Spermatozoa Üretimi / gr testis	24×10^6

Tavşan Spermasının Kısa Süreli Saklanması

Spermanın soğutulularak saklanması metabolizmayı azaltmakta ve uzun bir süre boyunca spermatozoon canlılığını korumaktadır. Bu süre boyunca spermatozoonlar, membranlarının yapısında bulunan fosfolipidlerdeki nispeten yüksek doymamış yağ asidi içerikleri nedeniyle, reaktif oksijen türlerine (ROS) ve serbest radikallere maruz kalmaktadırlar. Soğutulmuş spermanın başarısı kullanılan sperma sulandırıcısına, soğutma sıcaklığına ve spermatozoon yoğunluğuna bağlıdır (Kubovicova ve ark. 2022). Uluslararası Tavşan Reprodüksiyon Grubu'nun 2005 yılında yayımladıkları yönergelerine göre $15-18^\circ\text{C}$ 'nin, 48 saate kadar tavşan spermasını saklamak için en uygun sıcaklık aralığı olduğu belirlenmiştir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, Tris bazlı sulandırıcılarda 15°C 'lik sıcaklıkta 48-72 saate kadar tavşan spermatozoonlarının fertilitite yeteneklerini korudukları belirtilmiştir (Roca ve ark., 2000).

Tavşan Spermasının Uzun Süreli Saklanması

Tavşanlar, artan dünya nüfusunun beslenmesinde rol üstlenen hayvan türlerinden biridir. Bu nedenle artan talebin karşılanabilmesi için tavşan üretimi giderek önem kazanmakta ve bu doğrultuda çoğu ülkede tavşan üremesinin etkili bir şekilde sağlanabilmesi için tabii aşımın yanı sıra taze, sulandırılmış veya dondurulmuş sperma ile suni tohumlama uygulamaları yapılmaktadır.

Spermanın uzun süreli saklanması, birtakım işlemler uygulanan spermayı dondurup depolayarak korunmasını sağlayan yöntemdir (Zaniboni ve ark.,

2014). Kullanılan sulandırıcı tipi, hazırlanması, dondurulması gibi işlemler spermanın saklanabilirliğinin başarısını etkileyebilmektedir (Kubovicova ve ark., 2022). Tavşanlarda spermanın dondurulması, çözündürme sonrası sperma kalitesini düşürmekte ve elde edilen gebelik oranlarında düşüşe yol açmaktadır (Mocé ve ark., 2015). Tavşanlarda sperma; yavaş dondurma (Mocé and Vicente 2009), vitrifikasyon (Rossato ve Laffaldano 2013) ve liyofilizasyon teknikleri (Liu ve ark., 2004) ile dondurulabilmektedir.

Tavşanlarda Spermanın Sulandırılması

Sulandırıcılar, tavşan spermatozoonları için gerekli olan besinleri içerdiği ve ortamın pH'sı ile ozmotik basıncını kontrol ettiği için uzun süreli saklamada önemli bir rol oynamaktadır (Di Iorio ve ark. 2014). Bu amaçla sperma sulandırıcılarına çeşitli maddeler ilave edilmektedir. Spermanın sulandırılmasında bakteriyel kontaminasyona karşı antibiyotik katılmaktadır (Sönmez, 2015). Penisilin G ve Streptomisin tavşanlarda sulandırıcıya eklenen antimikrobiyal ajanlardan başlıcalarıdır (Chen ve Foote, 1994). Bu maddelerin haricinde; çoğu türde olduğu gibi tavşanlarda da sulandırıcıya değişik oranlarda (%10-20) yumurta sarısı eklenmektedir (Fox, 1961). Yapılan bazı çalışmalarda yumurta sarısı yerine yağsız süt tozu veya ticari bir ürün olan Laciphos kullanılmış fakat yumurta sarısı daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Rohlof ve Laiblin, 1976).

Tavşanlarda spermanın uzun süreli saklanmasında uygun bir sulandırıcı belirlemek için yapılmış birtakım araştırmalar mevcuttur (Roca ve ark., 2000; Carluccio ve ark., 2004; El-Kelawy ve ark., 2012). Tavşanlarda spermanın sulandırılmasında sıklıkla TCG (313.8 mM Tris, 103.1 mM sitrik asit ve 33.3 mM glukoz) kullanılmaktadır (Sevim ve Sariözkan, 2020). Yapılan bir çalışmada TCG, Lepus, Merk III ve Cortolap ile tavşan sperması sulandırılmış ve 72 saat sürenin sonunda en iyi sonucu Cortolap vermiştir (Di Iorio ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise Lepus, Verdunnungsmischung M III ve INRA 96 kullanılmış ve en iyi sonuç INRA 96'da elde edilmiştir (Carluccio ve ark., 2004).

Tavşan Spermasında Kullanılan Kriyoprotektan Maddeler

Tavşan spermasında kriyoprotektan ajan (CPA) olarak gliserol, DMSO ve amid türevleri kullanılabilir. Ancak yapılan bir çalışmada gliserolün başarısı daha düşük bulunmuştur (Mocé ve Vicente 2009). Diğer türlerin spermatozoon yapısından farklı olarak, tavşan spermatozoonu düşük bir su geçirgenlik katsayısı ve yüksek bir aktivasyon enerjisine sahiptir. Bu sebepten ötürü daha düşük moleküler ağırlıklı ve daha yüksek geçirgenliğe sahip DMSO veya amid gibi CPA'ları kullanma ihtiyacı ortaya çıkmıştır (Curry ve ark. 1995). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada DMSO %12.4-17.5 arasında kullanılmıştır (Sawada ve Chang, 1964). Fakat sonrasında yapılan bir çalışmada ise yüksek doz DMSO'nun spermatozoon akrozomu üzerinde olumsuz etkisinin olduğu belirtilmiştir (Martin Bilbao, 1993). Yapılan bir başka araştırmada da in vivo doğurganlık oranını düşürdüğü bildirilmiştir (Helleman ve ark., 1979). Elde edilen tüm bu sonuçlara istinaden yapılan bir çalışmada DMSO'nun olumsuz etkisi disakkaritlerin ilavesiyle minimize edilmeye çalışılmıştır (Vicente ve Viudes de Castro, 1996).

Amidler, gliserolden daha düşük moleküler ağırlığa sahip olup spermatozoonlarda daha az ozmotik hasara neden olmaktadır (Hanada ve Nagase, 1980). Tavşanlarda yapılan bir çalışmada 1M dozda laktamid, asetamid ve DMSO'nun en iyi sonuç verdiği ortaya koyulmuştur (Kashiwazaki ve ark., 2006). Asetamid, tavşan spermasının dondurularak saklanması için tercih edilen CPA'lardandır (Moriya, 1996).

SONUÇ

Reproduktif sahada yapılan deneysel çalışmalarda tavşanlar sıklıkla kullanılmaktadır. Tavşan spermasının işlenmesi ve saklanması konularında yapılan araştırmalar hala daha devam etmektedir. Bu işlemler sırasında hayvanın yaşı ve beslenmesi ile içerisinde bulunan mevsim sperma

kalitesini etkileyebilmektedir. Benzer şekilde spermanın işlenmesi sırasında sperma alma yöntemi, kullanılan sulandırıcı ve kriyoprotektan maddeler de spermatozoonların fertilité yeteneğini etkilemektedir. Araştırmalar tavşanlarda spermanın dondurma çözündürme sonrası total ve progresif motilite değerlerinin düştüğünü göstermektedir. Sonuç olarak tavşanlarda spermanın işlenmesi ve saklanması ile ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Alvarino JM., 2000. Reproductive performance of male rabbits. 7th Congreso Mundial de Cunicultura. Valencia, Spain, 4-7 July, 13-35.
- Bencheikh N., 1995. Effet de la fréquence de collecte de la semence sur les caractéristiques du sperme. *Ann Zoot*, 44, 263-279.
- Boiti C., Castellini C., Besenfelder U., Theau-Clément M., Liguori L., Renieri T., Pizzi F., 2005. Guidelines for the handling of rabbit bucks and semen. *World Rabbit Sci*, 13(2), 71-91.
- Carluccio A., Robbe D., De Amicis I., Contri A., Russo F., Paoletti M., 2004. Artificial insemination in rabbits: Laboratory and field trial with three different semen extenders. *World Rabbit Sci*, 12, 65-79.
- Chen Y., Foote RH., 1994. Survival of rabbit spermatozoa frozen and thawed at different rates with and without seeding. *Anim Reprod Sci*, 35(1-2), 131-143.
- Curry MR., Redding BJ., Watson PF., 1995. Determination of water permeability coefficient and its activation energy for rabbit spermatozoa. *Cryobiology*, 32, 175-181.
- Di Iorio M., Manchisi A., Rocco M., Chrenek P., Iaffaldano N., 2014. Comparison of different extenders on the preservability of rabbit semen stored at 5 C for 72 hours. *Ital J Anim Sci*, 13(4), 3444.
- El-Habbato HE., Radwan AA., El-Menoufy AA., 1984. Testicular and epididymal sperm reserves in three breed of rabbits under subtropical conditions. *Egypt Poultry Sci*, 4,63-80.
- El-Kelawy HM., Tawfeek MI., El-Gaafary MN., Ibrahim H., 2012. Viability and fertilizing ability of extended rabbit semen stored at 5°C. pp 285-289 in *Proc. 10th World Rabbit Congr.*, Sharm El-Sheikh, Egypt.
- Fox RR., 1961. Preservation of rabbit spermatozoa: Fertility results from frozen semen. *Proc Soc Exp Biol Med* 108, 663-665.
- Gogol P., 1999. Cryopreservation of plasma-deprived rabbit semen. *Ann Anim Sci*, 26, 85-92.
- Hanada A., Nagase H., 1980. Cryoprotective effects of some amides on rabbit spermatozoa. *Reproduction*, 60(1), 247-252.
- Helleman C., Krause D., Weitze KF., 1979. Congelación de semen de conejo. II. Efecto de la cantidad, motilidad espermática e integridad de acrosomas sobre fertilidad. *Arch Med Vet*, 11, 32-36.
- İleri K., Ak K., Pabuccuoğlu S., Birlir S., 2002. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. Ders Notu No, 133, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını, İstanbul.
- Kashiwazaki N., Okuda Y., Seita Y., Hisamatsu S., Sonoki S., Shino M., Inomata T., 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *Journal of Reprod Dev*, 52(4), 511-516.
- Kubovicova E., Makarevich A., Balazi A., Vasicek J., Chrenek P., 2022. Factors affecting rabbit sperm cryopreservation: A mini-review. *Zygote*, 30(1), 1-8.
- Liu JL., Kusakabe H., Chang CC., Suzuki H., Schmidt DW., Julian M., Pfeffer R., Bormann C. L., Tian XC., Yanagimachi R., Yang X., 2004. Freeze-dried sperm fertilization leads to full-term development in rabbits. *Biol Reprod*, 70, 1776-1781.

18. Luzi F., Maertens L., Mijen P., Pizzi F., 1996. Effect of feeding level and dietary protein on libido and semen characteristics of bucks. In: Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, vol. 2, 87-92.
19. Martín-Bilbao M., 1993. Congelación de semen de conejo. Efecto de algunos agentes crioprotectores sobre la viabilidad espermática, V Jornadas sobre Producción Animal, ITEA 12 (Supl. II), 486-488.
20. Mocé E., Blanch A., Talaván M., Viudes-de-Castro M., 2015. Effect of different freezing velocities on the quality and fertilising ability of cryopreserved rabbit spermatozoa. *Reprod Fert Dev*, 27, 846-851.
21. Mocé E., Vicente JS., 2009. Rabbit sperm cryopreservation: a review. *Anim Reprod Sci*, 110, 1-24.
22. Moriya T., 1996. Cryopreservation of semen from Japanese white rabbits for use in teratological studies. *Exp Anim*, 45, 403-404.
23. Naughton CK., Nelson DR., Thomas Jr AJ., 2003. Development of an inexpensive artificial vagina for semen collection from rabbits. *J Androl*, 24(5), 712-715.
24. Nizza A., Di Meo C., Taranto S., 2000. Influence of dietary protein content on libido and semen characteristics bucks. in: Proc. 7th World Rabbit Congr. Valencia jul, 217-224.
25. Nizza A., Di Meo C., Taranto S., 2003. Effect of collection rhythms and season on rabbit semen production. *Reprod Domest Anim*, 38(6), 436-439.
26. Orgebin-Crist M., 1968. Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit: estimation of daily sperm production. *J Reprod Fert*, 15,15-25.
27. Orihuela A., Ungerfeld R., 2019. Acoustic characteristics of vocalisations emitted by the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) during copula ejaculation and electro-ejaculation with or without anaesthesia. *World Rabbit Sci*, 27(3), 157-162.
28. Öztemel S., Doğan İ., Soylu MK., 2003. Beyaz Yeni Zelanda ırkı tavşanların kimi spermatolojik özellikleri. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, 22(1-2-3), 69-73.
29. Roca J., Martínez S., Vázquez J. M., Lucas X., Parrilla I., Martínez EA., 2000. Viability and fertility of rabbit spermatozoa diluted in Tris-buffer extenders and stored at 15°C. *Anim Reprod Sci*, 64(1-2), 103-112.
30. Rohloff D., Laiblin C., 1976. Deep-freezing of rabbit spermatozoa. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 89, 181-183.
31. Rossato MP., Laffaldano N., 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapour freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79, 508-516.
32. Sawada Y., Chang MC., 1964. Motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa after freezing in a medium containing dimethyl sulfoxide. *Fertil Steril*, 15, 222-229.
33. Sevim S., Sariözkan S., 2020. Kısa süreli saklanan tavşan spermasının spermatolojik parametreleri üzerine taxifolinin etkileri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 17(2), 164-172.
34. Sevinç A., 1973. Tavşanlarda Suni Tohumlama. A.Ü. Veteriner Fakültesi Zootečni Kürsüsü, 135-144.
35. Sönmez M., 2015. Reprodüksiyon suni tohumlama ve androloji ders notları, Elazığ.
36. Theau-Clément M., Lattaioli P., Roustan A., Castellini C., 1996. Reliability and accuracy of a computerized semen image analyses to evaluate various biological parameters in rabbit semen. in: Proc. 6th World Rabbit Congr., Toulouse, Jul., vol. 2, 139-143.
37. Vicente JS, Viudes de Castro MP., 1996. A sucrose-DMSO extender for freezing rabbit semen. *Reprod Nutr Dev*, 36, 485- 492.
38. Zaniboni L., Cassinelli C., Mangiagalli MG., Gliozzi TM., Cerolini S., 2014. Pellet cryopreservation for chicken semen: Effects of sperm working concentration, cryoprotectant concentration, and equilibration time during in vitro processing. *Theriogenology* 82, 251-258.

YAZARLARA BİLGİ

1. Atatürk Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nin hakemli bilimsel yayın organı olup, Mart ve Eylül aylarında olmak üzere yılda 2 kez yayımlanır. Derginin kısaltılmış ismi "Atatürk Üniversitesi Lab Hayv Bil & Uyg Derg" dir.
2. Bu dergide, Türkçe veya İngilizce dillerinden birinde hazırlanmış ve daha önce başka bir dergide yayınlanmamış veya başka bir dergiye eşzamanlı olarak sunulmamış Laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı "Tıp Hekimliği, Veteriner Hekimliği, Diş Hekimliği, Su Ürünleri, Fen Bilimleri, Ziraat, Eczacılık ve benzeri alanlarındaki laboratuvar hayvanlarının kullanıldığı alanlarında hazırlanmış orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu ve derlemeler yayımlanır.
3. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ve Uygulamaları Dergisine gönderilen ve materyal olarak laboratuvar hayvanı kullanılan orijinal araştırma makalelerinin tamamında etik kurul onayı olması zorunludur. Etik kurul onayının alındığı kurum ve onay numarası makalenin Materyal ve Metod kısmına yazılmalıdır. Yayın kurulu etik kurul onay belgesini isteme hakkına sahiptir.
4. Yazarlar, başka kaynaklardan alınan ve kullanılan materyal ile ilgili telif hakkı şartlarına uymak ve telif hakkının dergiye devrini ifade eden sözleşmeyi imzalamakla yükümlüdürler. Dergide yer alan yazılardan doğacak her türlü sorumluluk yazar(lar)'ına aittir.
5. Makaleler değerlendirme için en az iki hakeme gönderilir. Makale kabul sürecinde, iki hakemin görüşlerinin farklı olması durumunda editör veya üçüncü bir hakemin görüşü alınarak karar verilir.
6. Sorumlu yazar Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ve Uygulamaları Dergisine yayımlanmak üzere göndereceği makale ile birlikte "Makale Kontrol Formu"nu da göndermek zorundadır.
7. Atatürk Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ve Uygulamaları Dergisi' ne gönderilen makalelerde, makale değerlendirme süreci başladığı andan itibaren, makalede yazar ismi değişikliği ve isim sıralaması değişikliği yapılmaz.
8. Atatürk Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ve Uygulamaları Dergisi Editörlüğüne ulaşan makale ve makale kontrol formu, dergi editörlüğüne ön değerlendirmeye tabi tutulur. Editörlük, ön değerlendirme sonucuna göre makaleyi reddetme veya hakem değerlendirmesine tabi tutmadan önce düzeltme isteme hakkına sahiptir.
9. Atatürk Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Ve Uygulamaları Dergisi'nin etik politikası gereği intihale müsamaha gösterilmemektedir. Dergiye gönderilen tüm makaleler, uygun bir yazılım kullanılarak benzerlik yönünden kontrol edilir. Benzerlik oranı %15'den fazla olan makaleler (kaynaklar hariç) reddedilir.

10. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'na belirtilen "İhbarı Mecburi Hastalıklar" ile ilgili makalelerin değerlendirmeye alınabilmesi için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan alınmış izin yazısının Dergi Editörlüğüne sunulması zorunludur.

YAZIM KURALLARI

MAKALENİN HAZIRLANMASI

1. Makaleler, A4 dosya kâğıdına (tek yüz), çift satır aralıklı olarak, kenarlarından 3 cm boşluk bırakarak yazılmalı, şekil, tablolar ve kaynaklarda dâhil olmak üzere sayfa sayısı orijinal bilimsel araştırmalarda ve derlemelerde 16, olgu sunumu gibi kısa bilimsel çalışmalarda ise 5 sayfayı geçmemelidir.

2. Makale, Microsoft Word 6.0 veya daha üst versiyonda, Calibri karakterinde ve 12 punto ile hazırlanmalıdır. Makale Başlık Sayfası ve Ana Metin ayrı Word dosyaları halinde hazırlanıp yüklenmelidir.

3. Makaleye satır numaraları (makalenin 1. sayfasından başlamak üzere sürekli olacak şekilde) ve sayfa numaraları (sayfa altında ve ortalı) eklenmelidir.

4. Makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje, vb.) makale başlığının sonuna üst simge olarak * işareti konulup makale başlığı altında italik yazıyla açıklanmalıdır.

5. Araştırmaya konu olan maddelerin ve ürünlerin ticari adları kullanılmamalıdır.

6. Orijinal Bilimsel Araştırma Makaleleri İçin:

Kapak Sayfası: Makalenin birinci sayfası başlık, yazar isimleri ve adresleri, yazarların e-posta adresleri, sorumlu yazar iletişim bilgileri ve eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgidir oluşmalıdır.

Başlık: Türkçe ve İngilizce başlıklar sadece ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Makalenin dili Türkçe ise önce Türkçe sonra İngilizce başlık, makalenin dili İngilizce ise önce İngilizce sonra Türkçe başlık yazılmalıdır.

Yazar İsimleri ve Adresleri: Yazar(lar)'ın adı ve soyadının (akademik ünvanlı) sadece baş harfleri büyük ve başlığın altına ortalı gelecek şekilde yazılmalıdır. Sorumlu yazar (*) ile işaretlenmeli, yazarların isminin sağ üst köşesine sayı eklenmeli ve bu sayılar adresler bölümünde kullanılmalıdır. Yazarların adresinde; bağlı olduğu kurum, birim, şehir ve Ülke belirtilmelidir. Tüm yazarların ORCID numaraları kapak sayfasında belirtilmelidir.

Yazarların e-posta Adresleri: makalede ismi bulunan tüm yazarların ismi ve e-posta adresleri yazılmalıdır.

Sorumlu Yazar İletişim Bilgileri: Makalenin sorumlu yazarına ait isim-soyisim, e-posta, adres, telefon, GSM ve fax numaralarını içeren bilgiler yazılmalıdır.

Makale ile İlgili Açıklayıcı Bilgi: Eğer varsa makale ile ilgili açıklayıcı bilgiler (tez, proje

vb.) birinci sayfanın sonunda italik yazıyla açıklanmalıdır.

Ana Döküman 1. Sayfa: Makalenin 1. sayfası Türkçe özet ve anahtar kelimeler ile İngilizce özet ve anahtar kelimeleri içermelidir. Makale yazım dili Türkçe ise öncelikli olarak Türkçe özet ve anahtar kelimeler; eğer makale yazım dili İngilizce ise öncelikli olarak İngilizce özet ve anahtar kelimeler sunulmalıdır.

Özet: Kısaca amaç, materyal, metot, bulgular ve sonuçları içermelidir. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 kelime arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Anahtar kelimeler: Anahtar kelimeler “Türkiye Bilimleri Terimleri” nden seçilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com/tr-index.html>). En fazla 5 adet olmalıdır. Türkçe anahtar kelimeler Türkçe’ye göre, İngilizce anahtar kelimeler İngilizce’ye göre alfabetik olarak sıralanmalıdır. Her anahtar kelime arasına (.) işareti konulup, sonuncu anahtar kelimedenden sonrada (.) işareti konulmalıdır.

İkinci Sayfa: Makale üçüncü sayfadan itibaren “**GİRİŞ**”, “**MATERYAL ve METOT**”, “**BULGULAR**”, “**TARTIŞMA ve SONUÇ**”, Çıkar çatışması ve “**KAYNAKLAR**” bölümleri halinde tamamlanmalıdır. Bulgular ve tartışma birlikte verilebilir. Gerekli olduğu takdirde, teşekkür de eklenebilir. Bölüm başlıkları büyük harflerle yazılmalıdır. Bölümlere ait alt başlıklar yalnız ilk harfleri büyük olacak şekilde yazılmalıdır. Tüm başlıklar koyu tonda ve 12 punto ile satırbaşı hizasında yazılmalıdır.

İstatistiksel Analiz bilgileri: makalenin MATERYAL ve METOT bölümünün sonunda “**İstatistiksel Analiz**” başlığı altında verilmelidir.

Birimler ve Kısaltmalar: Her bir kısaltmanın açılımı metinde ilk geçtiği yerde verilmelidir. Birimler ve ölçülerde Uluslar Arası Standart birimleri (SI-sistem) kullanılmalıdır. Cins ve tür isimleri italik olarak yazılmalıdır. Makale içerisinde kullanılan rakamsal ve istatistiki verilerde nokta kullanılmalıdır (örnek: 44.5; 0.82; % 97.7; $P < 0.01$ vb.).

Tablo ve Şekiller: Tablo ve Şekiller ana dökümandan ayrı olarak gönderilmelidir. Tablolar Dikey sayfa olanlar genişlik 7 cm’ye sığacak şekilde en fazla 35 satır, yatay sayfaya 15 cm’ye sığacak şekilde en fazla 25 satır olmalıdır. Şekiller bulanık olmayacak şekilde, jpeg, tiff, bmp veya gif formatında ve en az 150 dpi çözünürlükte hazırlanmalı, şekil üzerine yazılan yazılar ve işaretlemeler aynı şekilde resim işleme programlarında (Photoshop, paint vs.) “Calibri” fontu ile 12 puntoyu geçmemesi gerekmektedir. Grafikler resim formatında değil doc, docx, xls veya xlsx formatında hazırlanmalıdır. Şekil, grafik, fotoğraf ve resimler başlıklarda ve metin içerisinde Şekil olarak ifade edilmelidir. Şekil ve tablolar metin içerisindeki sırasına göre numaralandırılmalı ve metin içerisinde kısaltılmadan yazılmalıdır (Örn; Şekil 1, Tablo 1). Tablo ve şekillerin başlık ve açıklamaları **hem Türkçe hem de İngilizce olarak**

eklenmelidir. Tablo ve şekillerde kullanılan her türlü kısaltma tablo ve şekil altında açıklanmalıdır.

Sonuç: Makaleye ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Olgu Sunumları İçin:

Kapak sayfası ve birinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 120’den daha az olmamalı ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

İkinci sayfadan itibaren “GİRİŞ”, “OLGU SUNUMU” (olgu sunumu başlığı altında materyal, metot ve bulgulardan bahsedilmelidir) “TARTIŞMA ve SONUÇ” “Çıkar çatışması”, ve “KAYNAKLAR” şeklinde tamamlanmalıdır.

Olgu sunumu içerisinde eğer varsa İstatistiksel analiz bilgileri, birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Olgu sunumuna ait elde edilen/varılan sonuç, “TARTIŞMA ve SONUÇ” kısmının sonunda “sonuç olarak...” ifadesiyle başlayan tek bir paragrafla belirtilmelidir.

Derlemeler İçin:

Birinci ve ikinci sayfalar orijinal bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde hazırlanmalıdır. Derlemeler için hazırlanan özet derlemenin konusu hakkında bilgi ve derlemenin amacından oluşmalıdır. Özetlerde kullanılacak kelime sayısı 170-200 arasında olmalıdır ve tek satır aralıklarla yazılmalıdır.

Derleme ikinci sayfadan itibaren “GİRİŞ” ile başlamalı, yazar/lar tarafından belirlenecek ara başlıklarla devam etmeli, “SONUÇ”, Çıkar çatışması ve KAYNAKLAR ile tamamlanmalıdır. Alt ana başlıklar 1, 1.1, 1.2, 2., 2.1 şeklinde numaralandırılmalıdır.

Derleme içerisinde eğer varsa birimler ve kısaltmalar, tablo ve şekiller bilimsel araştırma makaleleri kısmında anlatıldığı şekilde sunulmalıdır.

Derlemeye ait sonuç, KAYNAKLAR bölümünden hemen önce SONUÇ başlığı altında belirtilmelidir.

Çıkar Çatışması

Dergiye gönderilen makalenin türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme), makale içerisinde kaynaklar başlığından önce Çıkar Çatışması başlığı eklenmeli ve “yazarlar çıkar çatışması olmadığını beyan eder” ifadesi yazılmalıdır.

Kaynaklar

Kullanılan kaynak sayısı olgu sunumları için 10’dan az, araştırma makaleleri için 20’den az ve tüm makale türleri için 45’den fazla olmamalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kullanılan kaynakların (makalenin gönderildiği yıl baz alınarak) en az üçte birlik kısmı son 3 yıla ait olmalıdır.

Makale türü ne olursa olsun (orijinal araştırma makalesi, olgu sunumu, derleme) kaynaklar aşağıda belirtildiği şekilde sunulmalıdır:

Metin içerisinde: Metindeki tüm alıntılarda yazarın soyadı ve yayın yılı verilmelidir örn.: (Aydın, 2017). Yazarlar iki isim ise, her iki isme de atıfta bulunulur örn.: (Aydın ve Timurkan, 2015), yazarlar 3 veya daha fazla ise: ilk yazarın adı kullanılmalı, ardından “ve ark.” makale İngilizce ise “et al.” yazılmalıdır. örneğin: (Aydın ve ark., 2021). Birden fazla yazara atıfta bulunulursa, adları kronolojik olarak düzenlenir ve yayınları aynı yıl içindeyse - alfabetik olarak harflendirilir.

Yazar isminin kullanılacağı yerlerde ise yazarın soyadı ve yayın yılı Aydın (2015), Aydın ve ark. (2016) örneklerinde olduğu gibi yazılmalıdır.

Kaynaklar Bölümünde:

Metin içerisinde numaralandırılan kaynaklar, makalenin kaynaklar bölümünde harf sırasına göre sıralandırılmalıdır.

Kaynak verilen bilimsel dergilerin isimlerinin yazılmasında derginin isminin kısaltması kullanılmalıdır.

Kaynak makale ise; Barbour AH., Rampling A., Hormaeche CE., 2001. Variation in the infectivity of *Listeria monocytogenes* isolates following intragastric inoculation of mice. *Infect Immun*, 69, 4657-4660.

Kaynak kitap ise; Lawrie RA., 2002. *Lawrie Meat Science*. 6th ed., 330-335, Woodhead Publication, Cambridge.

Kaynak kitapta bir bölüm ise; Mark E., 1989. Thyroid diseases. In “Textbook of Veterinary Internal Medicine”, Ed., SJ Ettinger, 6th ed., 230-250, W.B. Saunders Company, Philadelphia.

Kaynak bir tez ise; Aktaş MS., 2005. Köpeklerde antibiyotiklerin neden olduğu ishallerde probiyotiklerden *Saccharomyces boulardii*'nin etkisi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.

Kaynak bir kuruluşun yayını ise; FAWC, 1991. Report on the european commission proposals on the transport of animals. London, MAFF Publication.

Kaynak bir yazılım ise; SAS, 1990. SAS user's guide: Statistics, 4th ed., Sas Institute, Cary.

Web tabanlı kaynaklar kullanılmamalıdır.

DERGİ BASKISI

Kabul edilen makaleler ücretsiz olarak Online basılacaktır.

Yazarlara ayrı baskı gönderilmeyecektir.

<https://dergipark.org.tr/tr/pub/jlasp>

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi
Journal of Laboratory Animal Science and Practice
Lab Hayv Bil & Uyg Derg / J Lab Anim Sci & Pract
YAYIN HAKLARI DEVRİ SÖZLEŞMESİ

Makale Türü: () Araştırma () Derleme () Olgu Sunumu () Diğer

Makale Başlığı:.....

.....

Biz türü ve başlığı yukarıda belirtilmiş makalenin yazarları olarak; Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi yazım ve yayın şartlarını bilerek ve kabul ederek hazırlayıp yayımlanması dileğiyle Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi Editörlüğüne gönderdiğimiz makalenin orijinal olduğunu, kısmen veya tamamen daha önce yayımlanmadığını veya eşzamanlı olarak başka bir yayın kuruluşuna gönderilmediğini, makale yayımlandıktan sonra ortaya çıkabilecek her türlü bilimsel ve etik sorumluluğun bize ait olduğunu ve Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'nin hiçbir sorumluluk taşımayacağını, danışman ve dergi editörü tarafından gerekli görülen düzeltmelerle birlikte her türlü yayın hakkını, yazının yayımlandığı tarihten itibaren Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi'ne devrettiğimizi taahhüt ederiz.

Bununla birlikte yazarların telif hakkı dışında kalan patent vb. tescil edilmiş hakları, yazarların kitap ve dersler gibi çalışmalarında makalenin tümü ya da bir bölümünü ücret ödemeksizin kullanım hakkı, ticari amaçla kullanmamak üzere makaleyi çoğaltma hakkı saklıdır.

Yazarın Adı ve Soyadı
(Makaledeki İsim Sırasına Göre)

İmza

Tarih

1
2
3
4
5
6
7
8

Sorumlu Yazar

Adı ve Soyadı:

Adres:

Telefon/Fax:

E-posta:

Tarih:.....İmza:.....

Not: Lütfen formu doldurduktan sonra derginin sitemine yükleyiniz veya e-posta adreslerimize gönderiniz.

DERGİ ADRESİ

Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, Deney Hayvanları Bilimi ve Uygulamaları Dergisi Editörlüğü, 25240 Kampüs/ERZURUM-TÜRKİYE

Tel: +90 442 3448762, E-posta: jlasp@atauni.edu.tr/



**TIBBİ DENEYSEL UYGULAMA VE
ARAŞTIRMA MERKEZİ**

Medical Experimental Application and
Research Center

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ / ATATÜRK UNIVERSITY

LABORATUVAR HAYVANLARI BİLİMİ VE UYGULAMALARI DERGİSİ / JOURNAL OF LABORATORY ANIMAL SCIENCE AND PRACTICES
