



Official Publication of
The Afyon Kocatepe University
Faculty of Veterinary Medicine

Kocatepe Veterinary Journal

2023, 16(2), June



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

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

DergiPark
AKADEMİK

ADVISORY BOARDS

Publisher

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

Editor in Chief

Prof. Dr. Musa KORKMAZ

Editors

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

Assist. Editors

Assoc. Prof. Dr. Muhammed Enes İNANÇ
Assoc. Prof. Dr. Ruhi TÜRKMEN
Dr. Özlem GÜCÜYENER HACAN
Dr. Özlem ÖZDEN AKKAYA

Section Editors

Prof. Dr. Alpaslan YILDIRIM
Prof. Dr. Sadullah BAHAR
Prof. Dr. Akın YAKAN
Prof. Dr. Kemal Kaan TEKİNŞEN
Assoc. Prof. Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU

Foreign Language Editor

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

Statistics Editors

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

Organising Committee

Prof. Dr. Fatih FİDAN
Prof. Dr. Metin ERDOĞAN
Assoc. Prof. Dr. Mustafa KABU
Assoc. Prof. Dr. Fatih AVDATEK
Dr. Barış DENK
Dr. Ümit ÖZÇINAR
Research Assist. Murat KIRIKKULAK
Research Assist. Hülya ATİK
Research Assist. Beste SARAÇOĞLU
Research Assist. Eda DEMİRTAŞ

Prof. Dr. Arif Altıntaş
Ankara University -Turkey
Prof. Dr. Atilla Şimşek
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Cevdet Uğuz
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Yavuz O. Birdane
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Demirkan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İlhami Çelik
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. İsmail Bayram
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Abdullah Kaya
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Mustafa Alişarlı
Ondokuz Mayıs University-Turkey
Prof. Dr. Nalan Bayşu Sözbilir
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Recep Aslan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Seyfullah Haliloğlu
Selçuk University-Turkey
Prof. Dr. Zafer Karaer
Ankara University-Turkey
Prof. Dr. Zehra Bozkurt
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. İbrahim Taşal
Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Şule Kaya
Mehmet Akif Ersoy University-Turkey
Prof. Dr. Korhan Altunbaş
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Aysun Demirkan
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Hasan Çiçek
Afyon Kocatepe University-Turkey
Prof. Dr. Fatih M. Birdane
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Süleyman Aypak
Adnan Menderes University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. Oktay Yılmaz
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assoc. Prof. Dr. İbrahim Kılıç
Afyon Kocatepe University-Turkey
Assist. Prof. Dr. M. Fatih Bozkurt
Afyon Kocatepe University-Turkey

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

Kocatepe Veterinary Journal;

indexed in TUBİTAK-ULAKBİM TR-Dizin, Turkey Citation Index, CAB Abstract, CrossRef, Google Scholar

Addressed:

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

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

www.kvj.aku.edu.tr

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

Only accepts online submission

Kocatepe Veterinary Journal
2023 June 16/2

Official Publication of
The Afyon Kocatepe University

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

The Reviewer List (in alphabetical order)

Abdullah ERYAVUZ	Afyon Kocatepe University
Ahmet Engin TÜZÜN	Aydın Adnan Menderes University
Alper ÇİFTÇİ	Ondokuz Mayıs University
Ayhan FİLAZİ	Ankara University
Barış DENK	Afyon Kocatepe University
Burcu ÜSTÜNER	Bursa Uludag University
Cangir UYARLAR	Afyon Kocatepe Üniversitesi
Deniz DİNÇEL	Bursa Uludağ University
Ekin Emre ERKILIÇ	Kafkas University
Esra ŞEKER	Afyon Kocatepe University
Evren ERDEM	Kırıkkale University
Fatih Mehmet KANDEMİR	Aksaray University
Faruk PEHLİVANOĞLU	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Hilal KAHRAMAN	Erciyes University
Kübra KARAKAŞ ALKAN	Konya Selçuk University
Kürşad YİĞİTARSLAN	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Mustafa UĞURLU	Ondokuz Mayıs University
Mustafa TEKERLİ	Afyon Kocatepe University
Murat SELÇUK	Ondokuz Mayıs University
Murat YAZLIK	Ankara University
Nurdan KARACAN SEVER	Dicle University
Oktay YILMAZ	Afyon Kocatepe University
Orkun BABACAN	Balıkesir University
Osman Safa TERZİ	Ankara University
Özlem ŞAHAN YAPICIER	Veterinary Central Control Research Institute
Özlem YILDIZ GÜLAY	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Pürhan Barbaros TUNCER	Mersin University
Selahattin KONAK	Afyon Kocatepe University
Sibel ALAPALA DEMİRHAN	Uşak University
Şeyda CENGİZ	Atatürk University
Timur GÜLHAN	Ondokuz Mayıs University
Uğur AYDOĞDU	Balıkesir University
Ünal YAVUZ	Harran University
Yunus ÇETİN	Burdur Mehmet Akif Ersoy University
Zafer USTA	Burdur Mehmet Akif Ersoy University

RESEARCH ARTICLES

Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity of Pasteurella Species in Cattle Slaughtered in Slaughterhouses in Kütahya Province (<i>Kütahya İlindeki Mezbalalarda Kesilen Sığırlarda Pasteurella Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı</i>) Seydi Mehmet ARSLAN, Beytullah KENAR	127-130
Expression Patterns of Some Lipogenic Genes and Fatty Acid Profile of Liver in Food-Restricted Rats (<i>Gıda Kısıtlaması Yapılan Ratlarda Karaciğerde Bazı Lipojenik Genlerin İfade Düzeyleri Ve Yağ Asidi Profili</i>) Hüseyin ÖZKAN, İrem KARAASLAN, Ufuk KAYA, Sevda DALKIRAN, İbrahim ALAKUŞ, Baran ÇAMDEVİREN, Hasan Hüseyin KEÇELİ Akın YAKAN	131-142
Effect of Anti-Mullerian Hormone, Metabolic Profile and Mineral Levels at Transition Period On The Calving – Conception Interval in Cows (<i>İneklere Geçiş Döneminde Anti-Müllerian Hormon, Metabolik Profil ve Mineral Düzeylerinin Buzağlama – Gebelik Aralığına Etkisi</i>) Mustafa İLERİTÜRK, Özgür KAYNAR	143-159
The Effects of Restraint and Cold Restraint Stress on Coagulation Indicators in Wistar Albino Rats (<i>Kısıtlama ve Soğuk Kısıtlama Stresinin Wistar Albino Sıçanlarda Pıhtılaşma Göstergeleri Üzerindeki Etkileri</i>) Çağlasu KOÇ, Mehmet EKİCİ	160-165
Cryopreservation of Ram Semen Using Capsaicin Supplemented Tris Extender (<i>Kapsaisin Katkılı Tris Sulandırıcı Kullanılarak Koç Spermalarının Dondurularak Saklanması</i>) Muhammed Enes İNANÇ, Fatih AVDATEK, Şükrü GÜNGÖR, Mehmet Fuat GÜLHAN, Kemal Tuna OLGAÇ, Barış DENK, Deniz YENİ, Umut TAŞDEMİR	166-173
Serum C-Reactive Protein, Procalcitonin, and Ceruloplasmin Concentrations in Dogs with Naturally Infected Ehrlichiosis (<i>Ehrlichiosis ile Doğal Enfekte Köpeklerde Serum C-Reaktif Protein, Prokalsitonin ve Seruloplazmin Konsantrasyonları</i>) Gülten Emek TUNA, Gamze Sevri EKREN AŞICI, Pınar Alkım ULUTAŞ	174-181
Evaluation of Some Trace Element Levels in Serum and Claw Tissue in Cattle with Different Claw Lesion (<i>Farklı Tırnak Lezyonu Bulunan Sığırlarda Serum ve Tırnak Dokusu Bazı İz Element Düzeylerinin Değerlendirilmesi</i>) Burak KESGİN, Musa KORKMAZ	182-194
Evaluation of Effectiveness of the Containing Energized Oxygen Molecules Herbal Product on the Wound Healing (<i>Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Bütüsel İçerikli Ürünün Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi</i>) Nurullah OKUMUŞ, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ, Özlem ERDAL ALTINTAŞ, Hasan Hüseyin DEMİREL, Sefa ÇELİK	195-208
Investigation and Epidemiology of Agents Isolated from the Lungs of Cattle, Sheep, and Goats with Pneumonia in the Marmara Region Using Bacteriological Methods (<i>Marmara Bölgesi'nde Pnömoni Görülen Sığır, Koyun ve Keçilerin Akciğerlerinden İzole Edilen Etkenlerin Bakteriyolojik Yöntemlerle Araştırılması ve Epidemiyolojisi</i>) Zeynep KÜÇÜK BAYKAN, Mehmet Hakan TABAK, Aslı KILIÇ, Hale GÜN, Alper METE	209-218
Investigations on Calving Interval and Dry Period in Anatolian Buffaloes Reared in Kütahya Province (<i>Kütahya İlinde Yetiştirilen Anadolu Mandalarında Buzağlama Aralığı ve Kuruda Kalma Süresi Üzerine Araştırmalar</i>) Kürşat ALKOYAK, Cüneyt KAPTAN, Mehmet Akif YÜKSEL	219-225
The Effect of Accessory Leaves on Digestion Degree and Fermentation Parameters at Increasing Levels on Sheep TMRs (<i>Koyun TMR'larına Artan Seviyelerde Akasya Ağaç Yapraklarının Sindirim Derecesi ve Fermentasyon Parametrelerine Etkisi</i>) Tuğba BAKIR, Bilal SELÇUK, Yakup BİLAL, Hülya AKÇAM	226-233
Investigation of Total Colostral IgG Produced by Holstein Cows in a Lactation (<i>Holştayn İneklere Bir Laktasyonda Üretilen Toplam Kolostral IgG'nin Araştırılması</i>) Erdal KARA, İlknur PİR YAĞCI, Buğrahan Bekir YAĞCI, Taha Burak ELİFOĞLU	234-240
CASE REPORTS	
The Efficiency of 7.2% Hypertonic Saline Solution on Echocardiographic Parameters in a Dog with Systemic Inflammatory Response Syndrome (<i>Sistemik Yangısal Yanıt Sendromlu Bir Köpekte %7.2'lik Hipertonik Salin Solüsyonunun Ekokardiyografik Parametreler Üzerine Etkisi</i>) Nilay ARSLAN, Cansu BALIKÇI, Songül ERDOĞAN, Hasan ERDOĞAN, Kerem URAL	241-247
Stereotypic Behaviour Observed in a Thoroughbred Horse after the Earthquake: Box Walking (<i>Deprem Sonrası Bir Safkan İngiliz Atta Gözlenen Stereotipik Davranış: Kendi Etrafında Dönme</i>) Yavuzkan PAKSOY, Özlem GÜCÜYENER HACAN	248-251

Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity of *Pasteurella* Species in Cattle Slaughtered in Slaughterhouses in Kütahya Province

Seydi Mehmet ARSLAN^{1*}, Beytullah KENAR²

¹Kütahya Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Kütahya, Türkiye

²Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabısar, Türkiye

ABSTRACT

In this study, it was aimed to isolate and identify *Pasteurella* species, which is one of the most important bacterial agents that cause bovine pneumonia, and to determine their antibiotic susceptibility as the most accurate approach in treatment. For this purpose, 210 lung samples were taken from cattle slaughtered in slaughterhouses in Kütahya. Sowing was performed on blood agar, Eosin methylene blue agar and MacConkey agar from the samples and 89 (42%) Gram negative bacteria were isolated. 17 bacteria showing the characteristics of *Pasteurella* species were identified in the automated Vitek 2 device. As a result of the identification, two (0.95%) isolates were found to be *Pasteurella multocida*. Antibiotic susceptibility of the isolates was investigated using the Kirby-Bauer disk diffusion test. It was observed that the isolates were 100% sensitive to amoxicillin clavulanic acid, enrofloxacin, ciprofloxacin and ceftiofur, 50% sensitive to danofloxacin, 50% sensitive at increased dosage, and 100% resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and tetracycline.

Keywords: Antibiotic sensitivity test, cattle, *Pasteurella* species, slaughterhouse

Kütahya İlindeki Mezbahalarda Kesilen Sığırlarda *Pasteurella* Türlerinin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılığı

ÖZ

Yapılan bu çalışmada sığır pnömonilerine sebep olan en önemli bakteriyel etkenlerden biri olan *Pasteurella* türlerini izole ve tanımlayarak tedavide en doğru yaklaşım olarak antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla Kütahya ilindeki mezbahalarda kesilen sığırlardan 210 akciğer örneği alındı. Örneklerden kanlı agar, Eosin methylene blue agar ve MacConkey agara ekimler gerçekleştirildi ve 89 (%42) Gram negatif bakteri izole edildi. *Pasteurella* türlerinin özelliklerini gösteren 17 bakteri otomatize Vitek 2 cihazında tanımlandı. İdentifikasyon sonucu iki (%0,95) izolatın *Pasteurella multocida* olduğu tespit edildi. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon testi kullanılarak araştırıldı. İzolatların amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine ise %50 duyarlı %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sülfametaksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik duyarlılık testi, kesimhane, *Pasteurella* türleri, sığır

To cite this article: Arslan S.M, Kenar B. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity of *Pasteurella* Species in Cattle Slaughtered in Slaughterhouses in Kütahya Province. Kocatepe Vet J. (2023):16(2):127-130

Submission: 01.09.2022 Accepted: 20.03.2023 Published Online: 06.04.2023

ORCID ID; SMA: 0000-0001-5532-1862, BK: 0000-0001-6573-680X

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

GİRİŞ

Pasteurella multocida çoğunlukla sığırların solunum sistemlerinden izole edilen, sığırlarda plöropnömoni ve bronkopnömoniyeye, sığır ve mandalarda septisemik pasteurellozis ve hemorajik septisemiye sebep olan bir etkindir (Bain ve ark., 1982). Hastalık Sığır Pastörollozu (Shipping fever) olarak bilinmektedir (Okay ve ark., 2011). Bu enfeksiyon Dünya ekonomisine önemli kayıplar vermektedir (Lax ve Chanter, 1990). Dünyanın birçok ülkesinde gözlemlenmenin yanı sıra oldukça geniş bir konakçı çeşidini içinde barındıran sığır pastörellozu, hastalığa etki ettiği düşünülen etkenlerin, hasta olmayan hayvanların üst solunum yolunda ve özellikle de yutak kısımlarında fakültatif patojen şeklinde yerleşerek oluşturduğu ve bu etkenlerin hayvanlarda direnci zayıflatıcı etkisi sebebiyle de hastalığa yakalanma riskini artırdığı belirtilmiştir (Aydın, 2006). *P. multocida*'nın, *Mannheimia haemolytica* ile birlikte bronkopnömonideki etkisi sığırların solunum sistemi enfeksiyonlarında birçok araştırmada bildirilmiştir (Miller ve ark., 2011, Taylor ve ark., 2015). Olumsuz çevre şartları, uygun olmayan hayvan transportu, bakteriyel ve viral etkenler sebebiyle oluşan stres, ruminantlarda solunum sistemi enfeksiyonlarında etkin faktörlerdir (Garcia-Alvarez, 2018). Hayvanlarda *P. multocida*'dan ileri gelen hastalıkların tedavisinde en çok kullanılan veteriner hekimlik ürünleri antibiyotiklerdir. Solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan başlıca antibiyotikler arasında birinci kuşak antibiyotiklerin yanında florokinolonlar gibi kritik öneme sahip antibiyotikler de yer almaktadır (Evira, 2018). Sunulan çalışmanın amacı, Kütahya İlindeki mezbahalarda kesilen sığırların akciğer örneklerinden *Pasteurella* türlerinin identifikasyonu ve identifiye edilen türlerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesidir.

MATERYAL ve METOT

Pasteurella türlerinin izolasyon ve identifikasyonu

Bu çalışmada Kütahya ilindeki kesimhanelerde kesilen sağlıklı görünümlü sığırların akciğerlerinden *Pasteurella* spp.'nin izolasyonu için 210 örnek toplandı. Toplanan örnekler steril numune kaplarında soğuk zincirde Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarına getirildi. Akciğer doku örneklerinden kanlı agar, Eosin methylene blue (EMB) agar ve MacConkey (MC) agara ekimler gerçekleştirildi ve 37 °C'de 24-48 saat süreyle inkübasyonu sağlandı. Üreyen kolonilerin makroskobik ve mikroskobik morfolojik özellikleri ve kanlı agarda hemoliz özellikleri incelendi (Aydın 2006, Garrity ve ark., 2004, Quinn ve ark., 2004). Gram negatif *Pasteurella* şüpheli koloniler, oksidaz ve katalaz

reaksiyonları ile MacConkey agar ve EMB agarda üreme durumlarına göre seçilerek, şüpheli izolatların kesin identifikasyonları Vitek 2 cihazı Gram negatif identifikasyon kiti kullanılarak gerçekleştirildi.

Antibiyotik duyarlılık testleri

İzolasyonu ve identifikasyonu sağlanan *P. multocida* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının tespiti Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Birliği Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (EUCAST) standartları kapsamında kanlı agarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Sığırlardan izole edilmiş olan *P. multocida* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını tespit etmek için, amoksisilin-klavulanik Asit (30 µg, Oxoid), tetrasiklin (30 µg, Oxoid), danofloksasin (5 µg, Oxoid), siprofloksasin (5 µg, Oxoid), seftiofur (30 µg, Oxoid), enrofloksasin (5 µg, Oxoid), sulfametoksazol-trimetoprim (20 µg, Oxoid) antibiyotik disklerinden yararlanıldı.

BULGULAR

İzolasyon ve identifikasyon bulguları

Mezbahada kesilen sığırlardan elde edilen 210 akciğer örneğinin 89'undan Gram negatif bakteri izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen bu bakterilere oksidaz ve katalaz testleri uygulanırken, bakterilerin kanlı agarda hemoliz özellikleri ile MacConkey ve EMB agarlarda üreme özellikleri test edildi. Buna göre 89 Gram negatif bakteriden 17'si *Pasteurella* türleri yönünden şüpheli olarak değerlendirildi. Şüpheli izolatların kanlı agarda hemoliz oluşturmadığı, katalaz ve oksidaz testlerine pozitif reaksiyon verdiği, MacConkey agarda üremediği, EMB agarda ise üreme olduğu ancak metalik yeşil renk vermediği gözlemlendi. Klasik kültürel yöntemler kullanılarak şüpheli olarak belirlenen 17 *Pasteurella* izolatının kesin identifikasyonu Vitek 2 otomatize sistem kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre 17 şüpheli izolatın ikisi (0.95%) *P. multocida* olarak identifiye edildi.

Antibiyotik duyarlılık testi bulguları

Identifiye edilen iki *P. multocida* izolatının antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. İzolatların amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine %50 duyarlı ve %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sulfametoksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edildi.

TARTIŞMA

Pasteurella enfeksiyonları gerek ülkemizde gerek dünyada ekonomik olarak büyük bir öneme sahiptir. Ruminantların solunum sistemi hastalıkları;

yetiştiriciler için fiziksel güç ve verim kaybıyla birlikte ölümlere ve tedavi masrafları sebebiyle büyük ekonomik kayıplara sebep olmaktadır (De Alvis, 1999).

Ruminantların solunum sistemi enfeksiyonlarından oldukça yüksek oranda *P. multocida* ve *M. haemolytica*'nın izole edildiği bazı çalışmalarda (Yates, 1982, Davies ve ark., 2004, Boyce ve ark., 2010) bildirilmiştir. Pnömonili buzağı akciğerlerinden *P. multocida* izolasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada, 61 adet akciğer örneğinin 18'inde (%29,5) *P. multocida* tespit edildiği bildirilmiştir (Madsen ve ark., 1985). Yine bir çalışmada pnömoni tablolı sığırların akciğerlerinden *P. multocida* izolasyon oranı %6 olarak bildirilmiştir (Houghton ve Gourlay, 1984). Allan ve ark., (1985) tarafından yapılan bir çalışmada, pnömoni sebebiyle ölmüş ya da kesilmiş buzağuların akciğerlerinden %15,8'inde *P. multocida* tespit edildiği bildirilmiştir. Danimarka'da yapılan bir çalışmada pnömoni tablosuna sahip buzağularda 72 akciğer örneğinin 10'undan (%13,8) *P. multocida* izolasyonunun sağlandığı bildirilmiştir (Tegtmeier ve ark., 1999). 1994-2002 yılları arasını kapsayan bir başka çalışmada pnömonili buzağuların akciğerlerinden *P. multocida* izolasyonunun %34,7 olduğu ve bu izolasyon oranının yıllar bazında değişiminin %20 ile %47,4 arasında olduğu bildirilmiştir (Welsh ve ark., 2004).

Türkiye'de Konak (2012) tarafından Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada, mezbahalardan toplanan 300 sığır akciğer örneğinde 22 (%7,3) *P. multocida* izolatının identifiye edildiği bildirilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından yapılan bir çalışmada mezbahadan alınan 200 adet pnömonik sığır akciğerinden 9 adet *P. multocida* (%4,5) identifiye edildiği bildirilmiştir. Karahan ve ark., (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, pnömoni semptomları gösteren 100 adet sığırdan akciğer örnekleri alınmış ve örneklerden etken identifikasyonu klasik yöntemler ve Vitek cihazı ile sağlanmıştır. Aynı çalışmada, izolasyonu ve identifikasyonu sağlanan 58 örneğin %13'ünden *P. multocida* identifiye edildiği bildirilmiştir. Elazığ'da yapılan bir çalışmada 8222 adet sığırdan alınan akciğer örneklerinden 500'ünde pnömoni tablosu tespit edilmiş olup; bakteriyolojik ve biyokimyasal yöntemler sonucu 30 (%6) örnekte *P. multocida* identifiye edilmiştir (Kılıç ve ark., 2004). Başka bir çalışmada pnömoni lezyonlu 100 buzağı akciğer doku örneğinin 8'inden *P. multocida* izole edilebildiği bildirilmiştir (Hazıroğlu ve ark., 1997). Dinler (1998) tarafından Erzurum'da pnömoni semptomlu sığırların akciğerlerinden %4,5 oranında *P. multocida* izolasyonu bildirilirken, konu ile ilgili bir başka çalışmada *P. multocida* izolasyon oranı %15,9 olarak belirtilmiştir (Gündüz ve Erganiş, 1998).

Hayvanlarda *P. multocida*'dan ileri gelen hastalıkların tedavisinde en çok kullanılan veteriner hekimlik ürünleri antibiyotiklerdir. Solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde kullanılan başlıca

antibiyotikler arasında birinci kuşak antibiyotiklerin yanında florokinolonlar gibi kritik öneme sahip antibiyotikler de yer almaktadır (Evira, 2018). Fransa'da 2012-2017 yılları arasında yapılan bir çalışmada sığırlardan elde edilen akciğer örneklerinde *P. multocida* izolatlarının antibiyotik dirençlilikleri izlenmiş; tetrasiklin (%23,4), tilmikosin (%17,2), flumequin (%14,3) ve enrofloksasin (%4,5), sülfametaksazol-trimetoprim (%6,2), amoksisilin (<%5) ve florfenikol (>%0) olarak gözlemlenmiştir (Bourelly ve ark., 2019). Türkiye'de Konak (2012) tarafından Afyonkarahisar'da yapılan bir çalışmada *P. multocida* izolatlarının %95,8 florfenikole, %93,8 seftiofura ve %91,7 oranında amoksisilin-klavulanik aside duyarlı olduğu; oksitetrasikline %22,9, penisilin G ve eritromisine ise %20,8 oranında dirençli olduğu bildirilmiştir. Moğulkoç (2020) tarafından yapılan çalışmada *P. multocida* izolatlarının %100 oranında enrofloksasin ve seftiofura duyarlılık gözlemlenirken sülfametaksazol-trimetoprim %33 oranında, tetrasikline ise %55 oranında direnç tespit edilmiştir.

SONUÇ

Sunulan çalışmada sığırlardan toplanan 210 akciğer örneğinden ikisinden (%0,95) *P. multocida* identifiye edildi. Bu çalışmada elde edilen izolasyon oranının diğer araştırmalarla karşılaştırıldığında oldukça düşük oranda olduğu gözlemlendi. Bunun en önemli nedeninin, diğer araştırmalardan farklı olarak bu çalışmada kullanılan örneklerin klinik olarak sağlıklı görünümlü sığırlardan toplanmasının olabileceği düşünüldü. Ayrıca örnek sayısı ve coğrafik farklılıkların da elde edilen düşük izolasyon oranında etkili olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada, *P. multocida* izolatlarının amoksisilin klavulanik asit, enrofloksasin, siprofloksasin ve seftiofura %100 oranında duyarlı, danofloksasine ise %50 duyarlı ve %50 artırılmış dozajda duyarlı olduğu gözlemlenirken, sülfametaksazol-trimetoprim ve tetrasikline %100 oranında dirençli olduğu tespit edilmiş olup, oranların son yıllarda yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

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

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

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

Açıklama: Bu makale birinci yazarın, ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinden üretilmiştir.

KAYNAKLAR

- Allan, EM., Wiseman, A., Gibbs, HA., Selman, IE. (1985). *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns. *Vet. Rec.*, 117: 629-631.
- Aydın, N (2006). *Pasteurellaceae* Familyası, 64–74. İçinde Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Kahraman M, Akay Ö, Ilgaz A, İzgür M, Diker K. S. Özel Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji, Bakteriyel Ve Mikotik İnfeksiyonlar, Medisan Yayın Serisi, No: 26, 4. Baskı, Ankara.
- Bain, RVS., De Alwis, MCL., Carter, GR., & Gupta, BK. (1982). Haemorrhagic septicaemia [of Bovidae]. *FAO Animal Production and Health Papers* (FAO).
- Bourelly, C., Cazeau, G., Jouy, E., Haenni, M., Madex, JY., Jarrige, N., Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance of *Pasteurella multocida* isolated from diseased food-producing animals and pets. *Veterinary microbiology*, 235, 280-284.
- Boyce, JD., Haerper, M., Wilkie, IW., Adler, B. (2010). *Pasteurella*. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. 325-337.
- Davies RL., Maccorquodale R., Reilly S. (2004). Characterisation of bovine strains of *Pasteurella multocida* and comparison with isolates of avian, ovine and porcine origin. *Vet. Microbiology.*, 99: 145-158.
- De Alvis, MCL. (1999). Haemorrhagic septicaemia. *Australian Centre For International Agricultural Research. Acıar Monograph, Australia*. 1-141.
- Dinler, U. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu ve identifikasyonu (Uzmanlık Tezi). Ankara.
- Evira (2018). Recommendations for the Use of Antimicrobials in the Treatment of the Most Significant Infectious and Contagious Diseases in Animals. *University of Helsinki Faculty of veterinary medicine*
- Garcia-Alvarez, A., Fernandez-Garayzabal, JF., Chaves, F., Pinto, C. and Cid, D. (2018). Ovine *Mannheimia haemolytica* isolates from lungs with and without pneumonic lesions belong to similar genotypes. *Veterinary microbiology*, 219, 80-86
- Garrity, GM., Brenner, DJ., Krieg, NR., Staley JR. (2004). *BERGEY'S MANUAL of SYSTEMATIC BACTERIOLOGY*, Vol. 2 The Proteobacteria, Part B. The Gammaproteobacteria.
- Gündüz, K., Erganiş, O. (1998). Pnömonili sığır akciğerlerinden izole edilen *Pasteurella haemolytica* suslarının biyotiplendirilmesi ve serotiplendirilmesi. *Veterinarium*, 9: 11-19.
- Hazıroğlu, R., Erdeğer, J., Gülbahar, MY., Kul, O. (1997). Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. *Dtsch. Tierarztl. Wschr.*, 104: 125-164.
- Houghton, SB., Gourlay, RN. (1984). Bacteria associated with calf pneumonia and their effect on gnotobiotic calves. *Res. Vet. Sci.*, 37: 194-198.
- Karahan, Ş., & Ekin, İH. (2020). Pnömonili Sığır Akciğer Örneklerinde *Mycoplasma bovis*'in Real Time PCR ile Araştırılması . XIV. Ulusal Veteriner Mikrobiyoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı) (ss.148-149). Konya, Türkiye
- Kılıç, A., & Muz, A. (2004). Pnömonili sığır akciğerlerinden bakteri izolasyonları ve izole *Pasteurella*'ların polimeraz zincir reaksiyonu ile saptanması. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28(1), 217-223.
- Konak, S. (2012). Afyonkarahisar İlinde Sığırlarda *Pasteurella multocida* İzolasyonu, Tiplendirilmesi, Antibiyotik Duyarlılıkları ve Bazı Virülens Genlerinin Pzr İle Belirlenmesi.
- Lax, JA., Chanter, N. (1990). *Pasteurella multocida* toxin, a potent mitogen, stimulates protein kinase c-dependent and-independent protein phin sosphorylation in Swiss
- Madsen, EB., Bisgaard, M., Mutters, R., Pedersen, KB. (1985). Characterization of *Pasteurella* species isolated from the lungs of calves with pneumonia. *Can. J. Comp. Med.*, 49: 63-67.
- Miller DS., Weiser, GC., Ward, ACS., Drew, ML., Chapman, PL. (2011). Domestic sheep (*ovis aries*) *Pasteurellaceae* isolates from diagnostic submissions to the caine veterinary teaching center (1990-2004). *Vet.Microbiol.*, 150(3-4): 284-288.
- Moğulkoç, M. N. (2020). Bazı sığır pnömoni etkenlerinin tespiti, karakterizasyonu ve PFGE yöntemi ile genotiplendirilmesi.
- Okay, S. (2011). Development of recombinant vaccines composed of plpe and ompH from *Pasteurella multocida* A:3. The Graduate School of Natural and Applied Sciences of Middle East Technical University Doctorate Thesis, Ankara
- Quinn, PJ., Markey, BK., Carter, ME., Donnelly, WJ., Leonard, F.C. (2004). *Veterinar Microbiology And Microbial Diseases*. Blackwell, Uk.
- Taylor, JD., Holland, BP., Step, DL., Payton, ME. And Confer, AW. (2015). Nasal isolation of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* as predictors of respiratory disease in shipped calves. *Research in veterinary science*, 99, 41-45.
- Tegtmeier C, Uttenthal A, Friis Nf, Jensen Ne, Jensen He (1999). Pathological and microbiological studies on pneumonic lungs from Danish calves. *Zentralbl. Veterinarmed. B.*, 46: 693-700.
- Welsh, RD., Dye, LB., Payton, ME., Confer, AW. (2004). Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 426- 431.
- Yates, WDG. (1982). A review of infectious ovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.*, 46: 225-263.

Expression Patterns of Some Lipogenic Genes and Fatty Acid Profile of Liver in Food-Restricted Rats

Hüseyin ÖZKAN^{1*}, İrem KARAASLAN², Ufuk KAYA³, Sevda DALKIRAN⁴, İbrahim ALAKUŞ⁵, Baran ÇAMDEVİREN⁴, Hasan Hüseyin KEÇELİ¹, Akın YAKAN¹

¹Department of Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

²Technology and Research & Development Center (MARGEM), Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

³Department of Biostatistics, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

⁴Department of Molecular Biochemistry and Genetics, Institute of Health Sciences, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

⁵Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, Hatay, Türkiye

ABSTRACT

This study aimed to determine food restriction effects on the profile of fatty acids and major genes on lipogenesis expressions in liver. 16 *Wistar albino* rats were divided into two groups and different diets were given to groups for 4-weeks. First group was fed ad libitum (Control group), another group was fed the half amount of the daily requirement (Food Restriction group, FR). As well as weekly food consumption and body weight changes, total cholesterol, HDL, LDL, and triglyceride levels were determined at the end of the feeding period. In addition to the fatty acid profile, *FASN* and *SCD-1* genes expression levels were measured in the liver. While the body weight averages decreased after 7 days and remained similar, plasma glucose levels were found lower in the FR. *FASN* was upregulated approximately 6 folds, and *SCD-1* increased insignificantly about 3 folds in the FR. C15:0, C18:1 n9 trans, C18:2 n6 cis, C21:0, C20:2, C20:5 n3, n6 and UFA were lower, while C16:0, C18:2 n6 trans, C20:3 n6, C22:6 n3, C22:1 n9, C22:2 and SFA were higher in FR. In addition to considering the exposure time and rate of food restriction, molecular activity and interactions in other metabolic organs should be investigated.

Keywords: fatty acids, food restriction, liver, *FASN*, *SCD-1*

Gıda Kısıtlaması Yapılan Ratlarda Karaciğerde Bazı Lipojenik Genlerin İfade Düzeyleri Ve Yağ Asidi Profili

ÖZ

Bu çalışma gıda kısıtlamasının karaciğerdeki yağ asidi profili ve majör lipojenik genlerin ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkilerini belirlemeyi amaçlamıştır. 16 adet *Wistar albino* rat iki gruba ayrılarak 4 hafta boyunca farklı diyetlerle beslenmiştir. Birinci grup (Kontrol grubu) ad libitum beslenirken, diğer gruba günlük ihtiyacın yarısı (Yem Kısıtlama grubu, YK) kadar yem verilmiştir. Haftalık besin tüketimi ve vücut ağırlığı değişimlerinin yanı sıra beslenme periyodu sonrasında total kolesterol, HDL, LDL ve trigliserit düzeyleri belirlenmiştir. Yağ asidi profiline ek olarak karaciğerde *FASN* ve *SCD-1* genlerinin ekspresyon seviyeleri ölçülmüştür. FR'nin ortalama vücut ağırlığı 7. günden sonra azalmaya başlarken, YK'de plazma glukoz seviyeleri kontrol grubuna kıyasla daha düşük bulunmuştur. YK grubunda *FASN* geni yaklaşık 6 kat artarken ($P<0,05$), *SCD-1* önemsiz olacak şekilde yaklaşık 3 kat artmıştır. FR grubunda C15:0, C18:1 n9 trans, C18:2 n6 cis, C21:0, C20:2, C20:5 n3, n6 ve UFA miktarı kontrole göre daha düşükken, C16:0, C18:2 n6 trans, C20:3 n6, C22:6 n3, C22:1 n9, C22:2 ve SFA miktarının daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Besin kısıtlamasının, maruz kalma süresi ve oranının dikkate alınmasına ek olarak, diğer metabolik organlardaki moleküler aktivite ve etkileşimler araştırılmalıdır.

Anahtar kelimeler: *FASN*, karaciğer, *SCD-1*, yağ asitleri, yem kısıtlama

To cite this article: Özkan H, Karaaslan İ, Kaya U, Dalkıran S, Alakuş İ, Çamdeviren B, Keçeli H.H, Yakan A. Expression Patterns of Some Lipogenic Genes and Fatty Acid Profile of Liver in Food-Restricted Rats. *Kocatepe Vet J.* (2023) 16(2):131-142

Submission: 09.09.2022 Accepted: 10.04.2023 Published Online: 10.05.2023

ORCID ID: 0000-0001-5753-8985, İK: 0000-0002-7485-192X, UK: 0000-0002-4805-0993, SD: 0000-0002-5704-5774, İA: 0000-0002-2031-7035,

BÇ: 0000-0003-1508-7869, HHK: 0000-0002-4017-8765, AY: 0000-0002-9248-828X

*Corresponding author e-mail: hozkan@mku.edu.tr

INTRODUCTION

The incidence of obesity and its complications has increased due to developments in agriculture, advances in technology, and dramatic changes in lifestyle (Ozkan and Yakan 2019). Obesity and its complications have become a major health issue affecting more than 500 million people in the world (Crovesy et al. 2020). Many different methods such as sustained food restriction, intense exercise, and diet regulation are used to control obesity (Laskowski 2012, Hill et al. 2012). Particularly, food restriction (FR) has various effects on energy metabolism (Dumas et al. 2004).

Energy metabolism is one of the leading factors for the continuation of healthy life due to metabolic regulation and related biological systems (Zhang et al. 2017). The energy needed by the organism is provided by the stored carbohydrates in the case of FR. Energy homeostasis is maintained by hydrolysis of triglycerides stored in satiety with the continuation of FR. As a result of FR, the lipolysis pathway is activated, and body weight decreases by the rapidly diminishing of adipose tissue (Barzilai and Gabrieli 2001, Smith et al. 2010). Moreover, FR increases oxidation of fatty acids and decreases synthesis of fatty acids for a certain period of time. In addition, it has been reported restriction of food or calorie cause downregulation of genes as Fatty Acid Synthase (*FASN*) and Stearoyl-CoA Desaturase (*SCD-1*) (Margolis et al. 2016). However, in the case of long-term FR, the balance in the lipolysis and lipogenesis pathways is rearranged and homeostasis is maintained.

The regulation of molecular pathways associated with FR and energy metabolism causes significant changes in the liver fatty acid profile. As well as other functions in the organism, fatty acids have important functions in the liver. Moreover, fatty acids are particularly essential molecules to provide glucose

production for metabolic energy regulation in the FR state (Rui 2014).

Although many studies have reported different effects of FR on the organism depending on the varying exposure time, limited information is known about the activity of major genes including the lipogenesis pathway and fatty acid profile of the liver (Bruss et al. 2010, Mulligan et al. 2008). In this study, as well as changes of body weights and some biochemical parameters, it has been aimed to determine the effects of 4-week FR on the profile of fatty acids and expression levels of *FASN* and *SCD-1* in the liver of rats. Moreover, the relationships between fatty acids and studied genes have been investigated. In this context, it has been aimed to better understand the effects of 4-week FR on fatty acid metabolism at the molecular levels in the liver.

MATERIAL AND METHOD

Animals and experimental design

This study was approved by Hatay Mustafa Kemal University Animal Experiments Local Ethics Committee (Decision No: 2021/04-02). *Wistar albino* male rats aged approximately 8 weeks were used in the study. Rats were fed without any restrictions for a week for acclimatization. Rats' food consumption was recorded during the acclimatization period for one week. Therefore, the daily food consumption was calculated (30.44 ± 2.2 g/rat/day). In addition, the sample size of the study was calculated with the G*Power software version 3.1.9.2. The statistical sample size calculation showed that at least 16 rats were needed, considering an effect size of 1.6, an alpha value of 0.05, and a power of 0.80. Sixteen rats were divided randomly into 2 groups (n=8). While the first group was fed with commercial food (Bil-Yem Ankara) *ad libitum* (Control group, Cont), the other group was fed with half amount of the daily

requirement (50% Food Restriction group, FR) (Gardner et al. 2010, Smyers et al. 2015). The protein and energy requirements were appropriate to the suggestion of the NRC (NRC, 1995). The ingredients of standard food were presented in Table 1.

During the feeding period, the animals were housed in transparent cages, with one animal in each cage. Environmental conditions in the place where the

animals were housed; 12 hours of light and 12 hours of darkness (07.00-19.00 light / 19.00-07.00 dark) and the humidity was regulated as 55%. The ambient temperature was adjusted to be $21\pm 2^{\circ}\text{C}$. The rats used in the study were checked twice daily (morning and evening), and in addition to weekly body weight changes, the consumption of food and water were recorded. Water was given *ad libitum* to all rats.

Table 1. Standard chow ingredient

	Ingredient (%)
Corn maize	29.00
Full-fat soybean	28.00
Sunflower seed meal	7.00
Wheat middling	13.00
Alfalfa meal	14.00
Meat bone meal	4.00
Molasses	1.75
Limestone	2.00
Dicalcium phosphate	0.50
NaCl	0.50
Vitamin-mineral premixes	0.25
Nutrient composition (calculated)	
Metabolic Energy (kcal/kg)	2600.00
Dry Matter (%)	88.40
Crude Protein (%)	22.50
Crude Cellulose (%)	8.10
Fat (%)	3.15
Carbohydrate (%)	54.72
Insoluble ash in HCl (%)	1.05
Ca (%)	1.30
P (%)	0.80

Euthanasia and sample collection

Following the four-week feeding period, the rats fasted for 12 hours while allowed to access water *ad libitum*. After 12 hours of fasting, the animals were euthanized by collected blood from the heart under Ketamine and Xylazine anesthesia. While the blood samples were kept at $+4^{\circ}\text{C}$, liver tissues were collected from the animals and sectioned into two parts. One of the pieces was quickly frozen in liquid nitrogen for molecular analysis, while another piece

was transported to -80°C in the cold chain for fatty acid analysis.

Biochemical analysis

Centrifugation was performed on the blood samples at 3000 xg at $+4^{\circ}\text{C}$ for 10 min. Obtained plasma was collected in new sterile and nuclease-free tubes. The plasma samples were stored at -80°C until analysis. Total cholesterol, glucose, triglyceride, HDL, and LDL parameter were determined with an auto-analyzer (Siemens Advia 1800, Japan).

Isolation of RNA and synthesis of cDNA

RNA isolation from liver samples was performed by the applying the modified Trizol method (Rio et al 2010). Approximately 50 mg of liver tissue exposed to 1 mL TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA). Following isolation of RNA, the RNA pellets were left to dry at room temperature for approximately 10 min. Then, samples were diluted with nuclease-free water (NFW). The quality of RNA samples was controlled by a nucleic acid meter (Merinton-SMA 1000). Also, RNA integrity was assessed on 1% agarose gel electrophoresis (100 V, 25 min).

DNA digestion was applied with a commercial kit (DNase I, RNase free, Thermo Fisher Scientific, USA) to the samples for elimination of gDNA. After this process, the synthesis of cDNA was applied to the RNA samples with RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The

reaction was in three steps: Following the 10 min at 25°C, the temperature was arranged as 37°C for 120 min, and 85°C for 5 min. End of the reaction, the volume of samples was completed to 150 µL with NFW. Until RT-qPCR application, samples were kept at -20°C.

RT-qPCR application

FASN and *SCD-1* genes amplifications were performed in duplicate from each sample. qPCR (Rotor Gene Q MDx 5plex HRM, Qiagen, ABD) application was performed with a commercial kit (Power SYBR Green PCR Master Mix, Thermo Fisher Scientific, USA). The reaction protocol in qPCR was as follows: 10 minutes at 95°C, followed by 15 seconds at 95°C, 60 seconds at 60°C, and 40 cycles. *PPIA* gene was used as the normalized gene for internal control (Table 2).

Table 2. Forward and reverse sequences of primers

Genes	Forward and Reverse Sequences	P.L.	Reference
<i>SCD-1</i>	F:5'-CCTTAACCCTGAGATCCCGTAGA-3' R:5'-AGCCCATAAAAGATTTCTGCAAA-3'	95	(Yasari et al. 2010)
<i>FASN</i>	F: 5'-GCTGCTACAAAACAGGACCATC-3' R: 5'-TCCACTGACTCTTCACAGACCA-3'	98	(Mock et al. 2017)
<i>PPIA</i>	F: 5'-CAGACAAAAGTTCCAAAAGACAGCA-3' R: 5'-CACCTGGCACATGAATCCT-3'	117	(Dos Santos et al. 2016)

P.L: Product Length

Fatty acid analysis of liver

Fatty acids were analyzed by using lipid extracts. Lipids were extracted with ether. Liver tissues were homogenized in ether. Then the tubes were shaken for 3 hours at room temperature. After 3 hours, they were placed in a heater to evaporate ether and lipids were collected. Fatty acids of samples were transmethylated to their fatty acid methyl esters

(FAME) using methanolic NaOH and methanolic Boron Trifluoride (BF₃). The FAME composition was determined by a gas chromatograph Shimadzu GC-2025 equipped with a Rt-2560 Restek column having 0.25 mm ID, 100 m length, 0.20 µm film thickness. The column temperature program was initiated at 100°C held for 2 min, raised by 4°C/min up to 250°C held for 15 min. The carrier gas was

hydrogen with a flow rate of 1.2 mL min⁻¹ and the split ratio was 50: 1. One μ L was injected by using an autosampler. The temperatures of the injector and detector were 250°C. As a reference standard, Restek FAME mix was used to recognize individual fatty acids. Fatty acid indexes were also calculated.

Statistical analysis

Before performing the significance tests, all variables were examined for assumptions of normality and homogeneity of variances. The differences in liver fatty acids and biochemical parameters were determined by Student's t test. Evaluation of rat weights in terms of group and time was examined with two-way mixed ANOVA. In addition, any significant terms were compared with Bonferroni adjustment. Expression analyzes of genes were performed according to the 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} method and calculated as fold change (Livak and Schmittgen 2001). The relationships between genes expression levels (*FASN* and *SCD-1*), liver fatty acids, and biochemical parameters were determined by Pearson

correlation coefficient and shown as a Heatmap. Significance level was P<0.05. For the analysis of data, IBM SPSS 23.0 was used.

RESULTS

The average daily food consumption of rats in Cont group was as follows: 30.15 g (1st week), 35.01 g (2nd week), 36.14 g (3rd week), and 34.26 (4th week). The weekly body weight gain of the rats in the Cont group was continuous and the body weight averages in all weeks were significantly different from each other during the feeding period (P<0.001). Body weight averages, which were similar at the beginning, were significantly different between the groups from the 1st week (P<0.001). The FR group body weight averages had a significant decrease after 7 days of the feeding period (P<0.001). On the other hand, body weight averages in the FR group, which were lower than at the beginning of the study, remained at similar levels throughout the study (Table 3).

Table 3. Changes in weekly body weight averages in groups (Mean \pm SE)

	Parameter	Body Weights Averages (g)	
	Groups	Cont	FR
Feeding Period	Initial BW	277.11 \pm 8.60 ^c	276.89 \pm 9.19 ^a
	1. week	317.94 \pm 6.83 ^{d, A}	241.29 \pm 7.31 ^{c, B}
	2. week	350.29 \pm 7.14 ^{c, A}	254.56 \pm 7.63 ^{b, B}
	3. week	368.39 \pm 8.20 ^{b, A}	260.67 \pm 8.77 ^{b, B}
	4. week	380.29 \pm 8.87 ^{a, A}	259.21 \pm 9.48 ^{b, B}
P	Group	<0.001	
	Time	<0.001	
	Group*Time	<0.001	

BW: Body Weights; **Cont:** Control; **FR:** Food Restriction

^{A,B:} Groups with different letters on the same line are different from each other.

^{a,b,c,d,e:} Groups with different letters in the same column are different from each other.

While plasma total cholesterol, triglyceride, HDL, and LDL levels plasma were similar in both the Cont and the FR groups, it was determined that the amount of

plasma glucose was significantly lower in the FR group (P<0.05) (Figure 1).

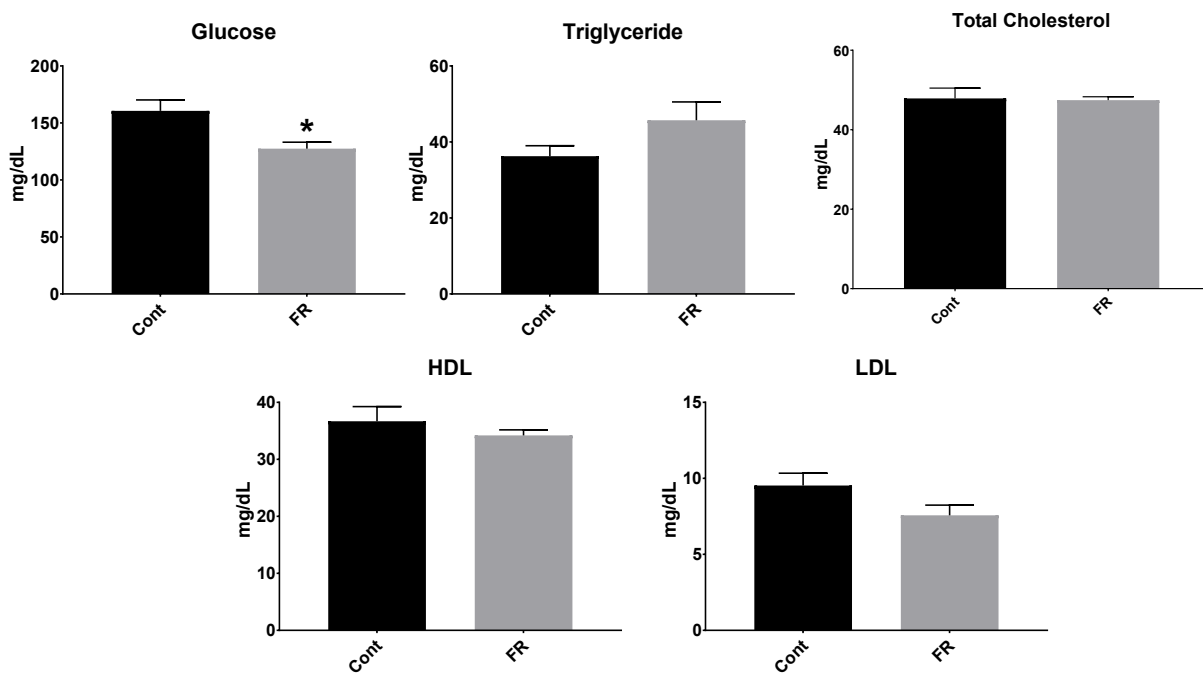


Figure 1: Plasma biochemical parameters in groups (Mean±SE).
 Cont: Control group; FR: Food Restriction group; *: P<0.05

According to the gene expression results, expression levels of *FASN* gene were approximately 6 folds more in the FR group compared to the Cont group

(P<0.001). Furthermore, approximately 3 folds insignificant upregulation was detected on the expression levels of *SCD-1* gene in the FR group (Figure 2).

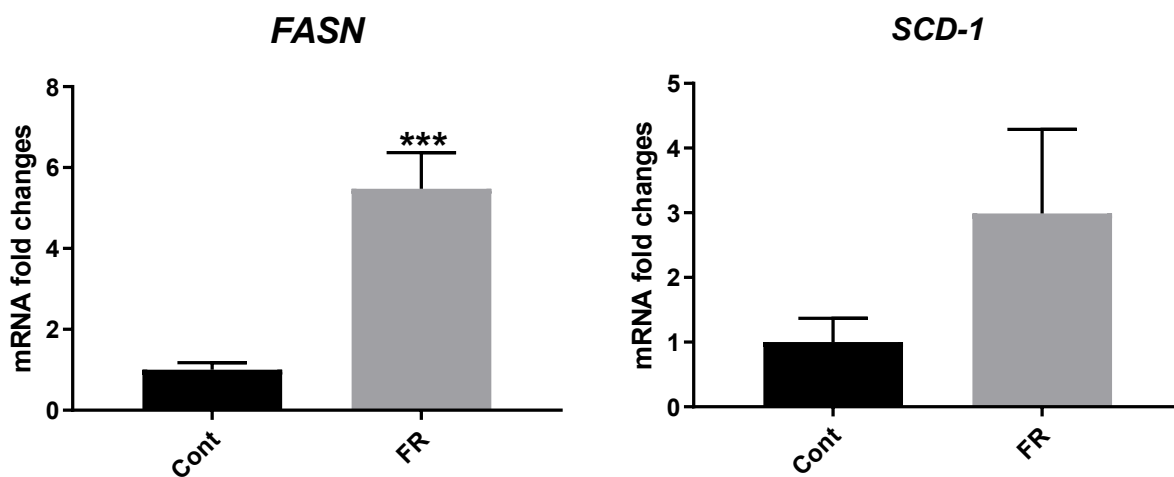


Figure 2: *FASN* and *SCD-1* genes expression levels in liver (Mean±SE).
 Cont: Control group; FR: Food Restriction group; ***: P<0.001

Compared to Cont group, the amounts of C15:0, C18:1 n9 trans, C18:2 n6 cis, C21:0, C20:2, C20:5 n3, n6 and UFA were found to be significantly lower in the FR group (P<0.05). On the other hand, C16:0,

C18:2 n6 trans, C20:3 n6, C22:2, C22:6 n3, C22:1 n9, fatty acids amounts and Saturated Fatty Acids (SFA) contents were higher in the FR group, significantly (P<0.05) (Table 4).

Table 4. Fatty acid profile of liver in groups (Mean \pm SE).

Fatty acids (%)	Cont.	FR	P
C10:0	0.10 \pm 0.02	0.10 \pm 0.03	-
C12:0	0.18 \pm 0.04	0.24 \pm 0.03	-
C14:0	0.38 \pm 0.03	0.44 \pm 0.05	-
C14:1	0.06 \pm 0.003	0.05 \pm 0.01	-
C15:0	0.33 \pm 0.02	0.25 \pm 0.01	*
C15:1	0.10 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03	-
C16:0	20.35 \pm 0.60	23.65 \pm 1.20	*
C16:1	0.91 \pm 0.15	0.73 \pm 0.05	-
C17:0	0.75 \pm 0.04	0.67 \pm 0.08	-
C17:1	0.18 \pm 0.02	0.16 \pm 0.01	-
C18:0	14.74 \pm 0.90	16.37 \pm 0.43	-
C18:1 n9 trans	2.03 \pm 0.33	0.72 \pm 0.17	**
C18:1 n9 cis	12.07 \pm 0.77	11.58 \pm 0.57	-
C18:2 n6 trans	0.19 \pm 0.01	0.26 \pm 0.03	*
C18:2 n6 cis	18.25 \pm 0.75	12.96 \pm 0.56	***
C20:0	0.50 \pm 0.06	0.33 \pm 0.08	-
C18:3 n6	0.34 \pm 0.06	0.55 \pm 0.13	-
C20:1	0.17 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01	-
C21:0	0.75 \pm 0.04	0.59 \pm 0.03	**
C18:3 n3	0.31 \pm 0.02	0.26 \pm 0.03	-
C20:2	3.65 \pm 0.58	2.04 \pm 0.31	*
C22:0	0.76 \pm 0.08	0.52 \pm 0.08	-
C20:3 n6	0.55 \pm 0.10	0.93 \pm 0.13	*
C22:1 n9	0.96 \pm 0.11	1.56 \pm 0.13	**
C20:3 n3	0.74 \pm 0.09	0.95 \pm 0.08	-
C20:4 n6	18.18 \pm 1.12	18.29 \pm 1.29	-
C22:2	0.58 \pm 0.10	2.84 \pm 0.65	*
C20:5 n3	0.48 \pm 0.05	0.26 \pm 0.04	**
C22:6 n3	0.36 \pm 0.12	0.85 \pm 0.12	*
SFA	39.37 \pm 0.99	44.00 \pm 1.20	**
MUFA	16.99 \pm 1.05	15.81 \pm 0.68	-
PUFA	43.64 \pm 0.55	40.19 \pm 1.67	-
UFA	60.63 \pm 0.99	56.00 \pm 1.20	**
n6	37.51 \pm 0.98	33.00 \pm 1.50	*
n3	1.90 \pm 0.12	2.32 \pm 0.23	-

Cont: Control; FR: Food Restriction; SFA: Saturated Fatty Acids; MUFA: Monounsaturated Fatty Acids; PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids; UFA: Unsaturated Fatty Acids; n6: Omega 6; n3: Omega 3-; P>0.05; *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001

A strong and positive correlation was detected between *FASN* and *SCD-1* genes expression levels in the liver ($P < 0.01$). In addition, it was determined that the *FASN* gene had a positive correlation with C16:0, C18:3 n6, C20:3 n6, C22:1 n9, C22:2 fatty acids, and SFA parameters at varying levels of significance. However, the *FASN* gene has a significant negative correlation with C18:1 n9 trans, C18:2 n6 cis, C20:0, C21:0, C20:5 n3, PUFA, UFA, n6 and LDL ($P < 0.05$). The results were presented in Figure 3. In terms of the relationship of the *SCD-1* gene with fatty acids and biochemical parameters, it showed a positive correlation with C14:0, C16:0, C18:3 n6, and SFA

content, and a significant negative correlation with PUFA, UFA, n6, and LDL ($P < 0.05$). Glucose was negatively correlated with SFA, while it was positively correlated with C18:1 n9 trans, C18:2 n6 cis, C20:1, C21:0, C20:2 and UFA parameters. On the other hand, triglyceride was negatively correlated with C14:1, C18:1 n9 trans, and C20:2, and positively correlated with C15:1 and C22:1 n9. As expected, positive correlation was found between HDL and total cholesterol, while LDL was negatively correlated with C20:3 n6 and positively correlated with C18:2 n6 cis, as well as target genes (Figure 3).

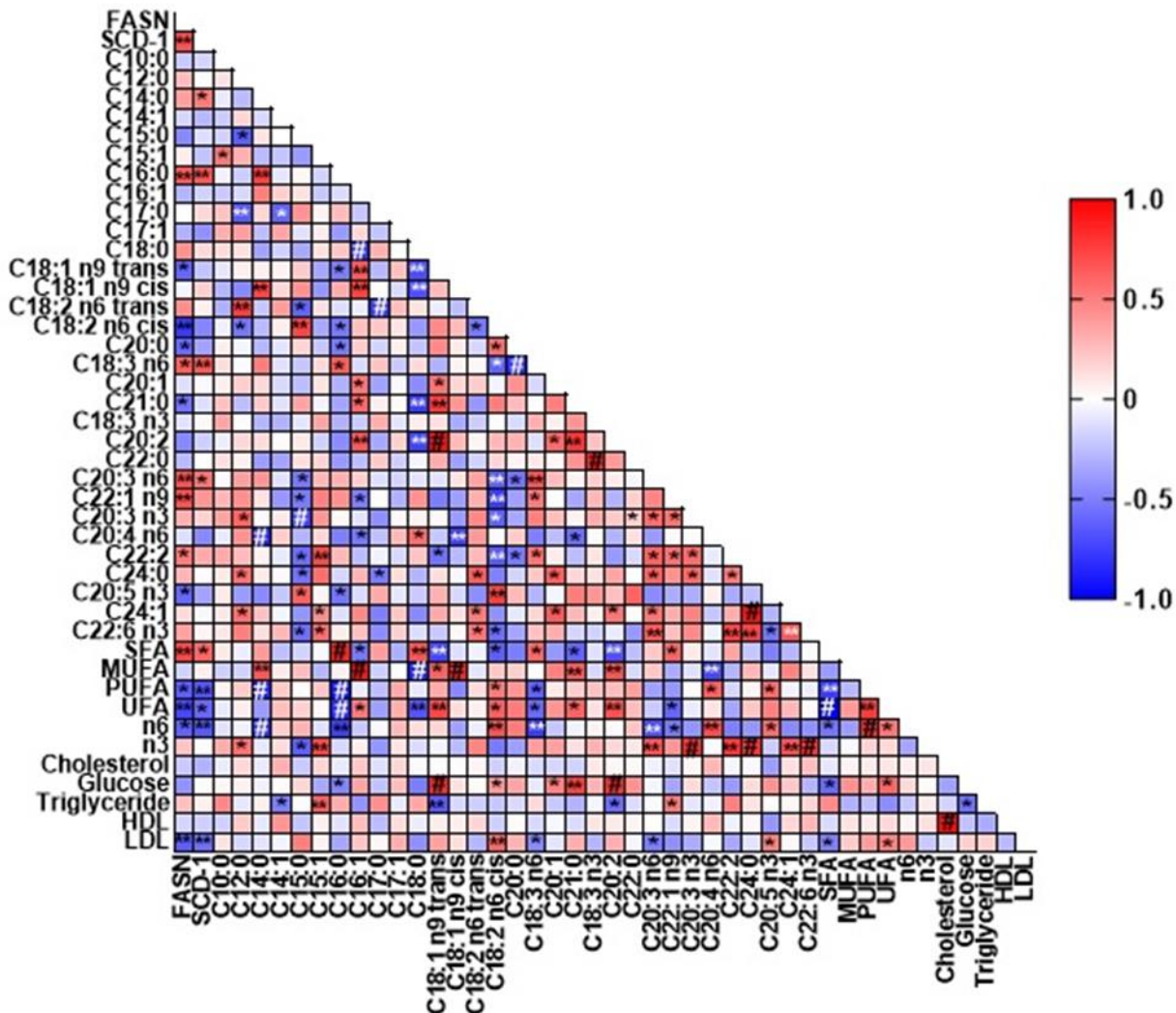


Figure 3: Correlations between studied parameters in heat map form

*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; #: $P < 0.001$

DISCUSSION

FR, which is applied at a changeable rate in all species including studies on metabolism, has important positive effects such as weight loss, prevention of chronic diseases, and prolongation of a lifetime (Mulligan et al. 2008). The effectiveness of FR is closely related to metabolic resistance (Levin and Dunn-Meynell 2000). Similar to our study findings, it has been reported in some studies that the body weights of rats treated with FR decreased (Bruss et al. 2010, Moraes et al. 2016, Margolis et al. 2016). However, Bruss et al. (2010) reported in their study that there was a loss of body weight at the end of 1 week in rats treated with FR compared to rats fed *ad libitum*, and there was no significant change in body weight averages for the next 4 weeks with FR. In a study, it was reported that FR, which was applied approximately 60%, caused a loss in body weight in the first week and a tendency to gain weight in the following weeks (21-28 days) (Moraes et al. 2016). In this study, it was determined that body weight averages gradually increased in rats fed *ad libitum* during the 4-week feeding period. Similar to the findings of Bruss et al. (2010) body weight loss occurred rapidly in the first week in the FR group, and body weight averages were maintained from the second week to the end of the feeding period in relation to metabolic resistance (Levin and Dunn-Meynell 2000).

Changes in body weight averages are closely related to metabolic regulation. Anabolic and catabolic events are re-regulated in the organism according to the caloric changes in the diet and exercise status. The protected body weight averages in FR group has continued the following weeks from the second week in this study. It has been deduced that the rate and exposure time to food and/or calorie restriction are one of the most important factors for the formation of this situation (Fu and Klaassen 2014).

It was determined that FR application during the 4-week feeding period did not cause a significant change in total cholesterol, HDL, LDL and triglyceride levels compared to the *ad libitum* fed group. Unlike humans, it was reported that mice and rats could tolerate dietary changes without alterations of plasma lipoproteins such as LDL (Flowers and Ntambi 2008). However, it was thought that the significant decrease in plasma glucose levels might be related to metabolic activity and body weight averages. Although Moraes et al. (2016) reported that 60% FR restriction applied for 3 weeks resulted in a significant decrease in total cholesterol and triglyceride levels along with glucose, it was thought that the main difference causing this situation might be related to the restriction rate and feeding period (Moraes et al. 2016, Zhang et al. 2021).

FASN and *SCD-1* genes expression levels tended to be upregulated in the FR group. *FASN* has a central role of lipogenesis in liver (Dorn et al. 2010). Mulligan et al. (2008) reported that as well as the decrease in body weight averages, *FASN* gene expression levels decreased in subcutaneous adipose tissue and liver in the first week, but tended to increase in the following periods in mice with long-term FR. In another study, it was reported that *SCD-1* gene expression levels increased in adipose tissues due to the prolongation of food restriction (Turyn et al. 2012). *FASN*, which is the protein encoded by the *FASN* gene, is involved in the synthesis of long-chain fatty acids using Acetyl-CoA, Malonyl-CoA and NADPH, in other words, it shows more lipogenic activity (Dorn et al. 2010). *SCD-1*, which is also involved in lipogenesis, is responsible for the regulation of lipogenesis in relation to genes involved in the lipogenesis pathway such as *FASN* and *SREBP-1c* (Ozkan and Yakan 2019). It has been thought that the upregulation in the related genes may

have been shaped by the metabolic resistance that developed to response to food restriction.

It was reported that food restriction increases fatty acid synthesis in the body (Bruss et al. 2010). In this study, although a significant calorie restriction was applied for 4 weeks in the FR group, C16:0 fatty acid and SFA levels with some of the long-chained fatty acids were found to be higher compared to the control group, basically consistent with *FASN* and *SCD-1* genes expression levels. It is known that *FASN* catalyzes the final stage of fatty acid biosynthesis and it is a crucial role to generate fatty acid de novo lipogenesis (Dorn et al. 2010). The regulation of fatty acid synthesis is a complex and intricate process in the liver. However, it has been understood that while the amount of SFA increased in the liver with the application of food restriction, the amount of UFA and n6 decreased. It has been thought that this situation might be caused by the signaling of the synthesis of essential fatty acids by the upregulation of genes responsible for more saturated fatty acid production such as *FASN* and *SCD-1* in the liver after metabolic regulation was rearranged. Activation of the *FASN* gene in the liver has a leading role especially in C16:0 biosynthesis and catalyzes the biosynthesis of saturated fatty acids in de novo lipogenesis (Dorn et al. 2010, Jensen-Urstad and Semenkovich 2012). Similar to our results, it has been reported there is a positive correlation between *SCD-1* and C16:0 and C18:0 fatty acids (Miyazaki and Ntambi 2003). On the other hand, Kunešová et al. (2006) reported in their study that after restricted dietary regulation in obese people, the amount of C16:0 increased, while the amount of C18:2 n6 and C20:3 n6 decreased. Although energy regulation in rodents and humans is mostly similar, it is conceivable that minor differences may be due to species differences.

In addition to differences in measured parameters between groups, variable interactions were

determined between genes and other parameters. In addition to LDL, *FASN* and *SCD-1* genes expressions were found co-correlated with many fatty acid parameters. LDL was detected negatively correlated with *FASN* and *SCD-1*. It was reported that *SCD-1* deficiency led to a decrease the synthesis of LDL in the liver (Flowers and Ntambi 2008). As expected, strong and negative correlations were found between these genes and PUFA, UFA and n6 parameters. *FASN* and *SCD* were positively correlated with C16:0, which has a key role in de novo lipogenesis (Dorn et al. 2010, Jensen-Urstad and Semenkovich 2012). Interestingly, these genes were positively correlated with the various significances with long and unsaturated fatty acids such as C20:3 n6. This showed that the related genes may have important roles related to regulation of unsaturated and long-chained fatty acids in addition to their main functions in the liver.

Undoubtedly, metabolic regulation is closely related to molecular activity at the transcriptional level. The obtained findings of this study suggest that increased SFA contents with food restriction in the liver are regulated by upregulated lipogenic genes mainly *FASN* and *SCD-1*.

CONCLUSION

In conclusion, remarkable changes occur with the exposure time and ratio of restriction in FR. Considering that metabolism is also related to muscle and adipose tissues, it is thought that more studies are needed to understand the interactions with other organs at the molecular levels in food restriction.

Ethical Approval: This study was ethically approved by HMKU HAYDEK with the number 2021/04-02 and the date 16.06.2021.

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

Authors contribution rate: HO: %25, IK: %15, UK: %15, SD: %10, ĪA: %5, BÇ: %5, HHK: %5, AK: %20

REFERENCES

- Barzilai N, Gabriely I.** The role of fat depletion in the biological benefits of caloric restriction. *J Nutr.* 2001; 131(3): 903S-906S.
- Bruss MD, Khambatta CF, Ruby MA, Aggarwal I, Hellerstein MK.** Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298(1): E108-E116.
- Crovesy L, Masterson D, Rosado EL.** Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *Eur J Clin Nutr.* 2020; 74(9): 1251-1262.
- Dorn C, Riener MO, Kirovski G, Saugspier M, Steib K, Weiss TS, Gäbele E, Kristiansen G, Hartmann A, Hallerbrand C.** Expression of fatty acid synthase in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010; 3(5): 505.
- Dos Santos BP, da Costa Diesel LF, da Silva Meirelles L, Nardi NB, Camassola M.** Identification of suitable reference genes for quantitative gene expression analysis in rat adipose stromal cells induced to trilineage differentiation. *Gene.* 2016; 594(2): 211-219.
- Dumas JF, Roussel D, Simard G, Douay O, Foussard F, Malthiery Y, Ritz P.** Food restriction affects energy metabolism in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2004; 1670(2): 126-131.
- Flowers MT, Ntambi JM.** Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol.* 2008; 19(3): 248.
- Fu ZD, Klaassen, CD.** Short-term calorie restriction feminizes the mRNA profiles of drug metabolizing enzymes and transporters in livers of mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014; 274(1): 137-146.
- Gardner CD, Kim S, Bersamin A, Dopler-Nelson M, Otten J, Oelrich B, Cherin, R.** Micronutrient quality of weight-loss diets that focus on macronutrients: results from the A TO Z study. *Am J Clin Nutr.* 2010; 92(2): 304-312.
- Hill JO, Wyatt HR, Peters JC.** Energy balance and obesity. *Circulation.* 2012; 126(1): 126-132.
- Jensen-Urstad AP, Semenkovich CF.** Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger? *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2012; 1821(5): 747-753.
- Kunešová M, Braunerova R, Hlavatý P, Tvrzická E, Stanková B, Skrha J, Hilgertová J, Hill M, Kopecký J, Wagenknecht M, Hainer V, Matoulek M, Pařízková J, Zák A, Svacina S.** The influence of n-3 polyunsaturated fatty acids and very low calorie diet during a short-term weight reducing regimen on weight loss and serum fatty acid composition in severely obese women. *Physiol Res.* 2006; 55(1): 63-72.
- Laskowski ER.** The role of exercise in the treatment of obesity. *PM&R.* 2012; 4(11): 840-844.
- Levin BE, Dunn-Meynell AA.** Defense of body weight against chronic caloric restriction in obesity-prone and-resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 278(1): R231-R237.
- Livak KJ, Schmittgen TD.** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *Methods.* 2001; 25(4): 402-408.
- Margolis LM, Rivas DA, Ezzyat Y, Gaffney-Stomberg E, Young AJ, McClung JP, Fielding RA, Pasiakos SM.** Calorie restricted high protein diets downregulate lipogenesis and lower intrahepatic triglyceride concentrations in male rats. *Nutrients.* 2016; 8(9): 571.
- Miyazaki M, Ntambi JM.** Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in lipid metabolism. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 68(2): 113-121.

- Mock K, Lateef S, Benedito VA, Tou JC.** High-fructose corn syrup-55 consumption alters hepatic lipid metabolism and promotes triglyceride accumulation. *J Nutr Biochem.* 2017; 39: 32-39.
- Moraes CD, Oliveira CAD, Amaral, MEC, Landini GA, Catisti R.** Liver metabolic changes induced by conjugated linoleic acid in calorie-restricted rats. *Arch Endocrinol Metab.* 2016; 61: 45-53.
- Mulligan JD, Stewart AM, Saupe KW.** Downregulation of plasma insulin levels and hepatic PPAR γ expression during the first week of caloric restriction in mice. *Exp Gerontol.* 2008; 43(3): 146-153.
- NRC.** Nutrient Requirements of Laboratory Animals. Fourth Revised Edition. Washington (DC): National Academies Press (US) 1995; 11-58.
- Ozkan H, Yakan A.** Dietary high calories from sunflower oil, sucrose and fructose sources alters lipogenic genes expression levels in liver and skeletal muscle in rats. *Ann Hepatol.* 2019; 18(5): 715-724.
- Rio DC, Ares M, Hannon GJ, Nilsen TW.** Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010; 2010(6): pdb-prot5439.
- Rui L.** Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol.* 2014; 4(1): 177.
- Smith DLJ, Nagy TR, Allison DB.** Calorie restriction: what recent results suggest for the future of ageing research. *EJCI.* 2010; 40(5): 440-450.
- Smyers ME, Bachir KZ, Britton SL, Koch LG, Novak CM.** Physically active rats lose more weight during calorie restriction. *Physiol Behav.* 2015; 139: 303-313.
- Turyn J, Mika A, Stepnowski P, Swierczynski J.** Unusual increase of Scd1 and Elovl6 expression in rat inguinal adipose tissue. *Open Life Sci.* 2012; 7(2): 192-200.
- Yasari S, Prud'homme D, Wang D, Jankowski M, Levy É, Gutkowska J, Lavoie JM.** Exercise training decreases hepatic SCD-1 gene expression and protein content in rats. *Mol Cell Biochem.* 2010; 335(1): 291-299.
- Zhang L, Huang YJ, Sun JP, Zhang TY, Liu TL, Ke B, Shi XF, Li H, Zhang GP, Ye ZY, Hu J, Qin J.** Protective effects of calorie restriction on insulin resistance and islet function in STZ-induced type 2 diabetes rats. *Nutr Metab.* 2021; 18(1): 1-10.
- Zhang X, Heckmann BL, Campbell LE, Liu J.** G0S2: A small giant controller of lipolysis and adipose-liver fatty acid flux. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2017; 1862(10): 1146-1154.

Effect of Anti-Mullerian Hormone, Metabolic Profile and Mineral Levels at Transition Period On The Calving – Conception Interval in Cows

Mustafa İLERİTÜRK^{1*}, Özgür KAYNAR²

¹ Department of Animal Science, Horasan Vocational College, Ataturk University, 25800, Erzurum, Türkiye,

² Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Kastamonu University, 37150, Kastamonu, Türkiye

ABSTRACT

The transition period in dairy cows is generally accepted as the period covering 3 weeks before calving and 3 weeks after calving. The aim of the study was to compare the profiles of β -hydroxybutyrate, calcium, magnesium, phosphorus, total cholesterol, total protein, triacylglycerol, free glycerol, serum lipid and serum protein with Anti-Mullerian Hormone (AMH) in dairy cows in the transition period, and to determine whether AMH to examine whether it can be used as a marker in the next insemination period. The cows whose blood samples were taken were followed up and it was determined that they became pregnant at the insemination and the study was terminated. According to the results obtained; It was determined that BHB and free glycerol, which are important markers of negative energy balance (NEB), have an effect on AMH concentration. However, it was determined that the concentration of magnesium and the ratio of cholesterol ester in serum total fat did not change much during the transition period. Our results suggest that AMH is a good biomarker of decreased follicular activity due to NEB in the transition period and that AMH can be used for herd weeding in reinsemination.

Keywords: AMH, Cow Pregnancy, Insemination, Metabolic Profile, Transition Period

İneklerde Geçiş Döneminde Anti-Müllerian Hormon, Metabolik Profil ve Mineral Düzeylerinin Buzağılama – Gebelik Aralığına Etkisi

ÖZ

Sütçü ineklerde geçiş dönemi genel kabul ile buzağılamadan önceki 3 hafta ile buzağılamadan sonraki 3 haftayı kapsayan süreçtir. Bu çalışmanın amacı geçiş dönemindeki sütçü ineklerde negaif enerji dengesinden (NED) dolayı değişen β -hidroksibütirat, kalsiyum, magnezyum, fosfor, total kolesterol, total protein, triasilgliserol, serbest gliserol, serum lipid ve serum protein profillerinin Anti-Müllerian Hormon (AMH) ile karşılaştırılarak AMH'nin bir sonraki tohumlama döneminde belirteç olarak kullanılıp lullanılmayacağını incelemektir. Kan örnekleri alınan inekler daha sonra takip edilerek kaçınıcı tohumlamada gebe kaldıkları tespit edildi ve çalışma sonlandırıldı. Santrifüj edilerek serumları toplanan kanlar analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre; NED'in önemli belirteçlerinden BHB'nin ve serbest gliserolün AMH konsantrasyonu üzerine etkisi olduğu saptandı. Bununla birlikte, magnezyumun konsantrasyonunun ve serum toplam yağı içerisindeki kolesterol esteri oranının geçiş döneminde fazla değişmediği tespit edildi. Sonuçlarımız AMH'nin geçiş döneminde NED'den dolayı azalan follüküler aktivitenin iyi bir biyobelirteci olduğunu ve tekrar tohumlamada AMH'nin sürü ayıklama için kullanılabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: AMH, Geçiş Dönemi, İneklerde Gebelik, Metabolik Profil, Tohumlama

To cite this article: İleritürk M. Kaynar Ö. Effect of Anti-Mullerian Hormone, Metabolic Profile and Mineral Levels at Transition Period On The Calving – Conception Interval in Cows. (2023):16(2):143-159

Submission: 29.07.2022 Accepted: 25.04.2023 Published Online: 17.05.2023

ORCID ID; Mİ: 0000-0002-4581-4492, ÖK: 0000-0002-2875-423X

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

INTRODUCTION

The transition period in dairy cows is defined as the period between 3 weeks before calving (close-up dry period) and 3 weeks after calving (early fresh period), during which critical physiological changes occur due to the emergence of many metabolic and infectious diseases (Drackley 1999, Grummer 1995). During this period, physiological, nutritional, metabolic and immunological changes occur in the cow, starting from late pregnancy, continuing with milk synthesis and secretion, and finally reaching a stable lactation phase (Van Saun 2016, Wankhade et al. 2017).

As a result of decreased dry matter intake during late pregnancy, energy requirement is provided by insulin resistance in adipose tissue and muscle, together with increased sensitivity to lipolytic agents (Bell 1995); These events reduce peripheral glucose uptake and facilitate the utilization of endogenous substrates, most of which are glucogenic amino acids from endogenous protein sources, and glycerol from adipose tissue mobilization (Putman et al. 2018). Inflammatory and oxidative stress experienced during parturition cause a significant increase in energy requirements with the onset of milk production (Turk et al. 2004). Meanwhile, the decreased plasma progesterone level with the transient rise in glucocorticoid and estrogen further reduces dry matter intake (Drackley et al. 2005, Ingvarstsen 2006). The imbalance between energy production and consumption causes negative energy balance (NEB) (Grummer et al. 2004). Many tissues, including adipose tissue, are mobilized to produce energy in order to tolerate the imbalance.

Approximately 30-50% of dairy cows are affected by one or more metabolic or infectious diseases during the transition period (LeBlanc 2010). These include ketosis, mastitis, metritis, retention of secundinarum and abomasum displacement. Anti-mullerian hormone (AMH), a dimeric glycoprotein produced by granulosa cells of growing preantral and

antral follicles, is a marker of ovarian reserve in dairy cows (La Marca et al. 2010, Rico et al. 2009). The concentration of AMH in the bloodstream is highly variable among different cows, but the measurements in the same cow are highly reproducible (Gobikrushanth et al. 2017, Ribeiro et al. 2014, Souza et al. 2015). Blood AMH concentration changes in cattle are related to nutritional condition, subspecies, breed, and lactation (Batista et al. 2014, Mossa et al. 2013) Cows with low plasma AMH concentration have a low conception rate (Gobikrushanth et al. 2018).

The aim of this study is to examine the relationship between AMH, calcium, phosphorus, cholesterol (Chol), total protein, magnesium, triacylglycerol (TAG), β -Hydroxybutyrate (BHB), free glycerol levels, serum lipid and protein profiles of dairy cows from the 14th day before calving to the 21st day after calving, and the number of inseminations of the cows in the next insemination period

MATERIAL and METHODS

Experimental Animals

The animal material of the study consisted of 36 simmental dairy cows with similar body condition scores in the 2nd lactation at Nail Cinisli Dairy Farm located in Aşkale district of Erzurum province. Dairy cows were grouped as inseminated once (T1, n=13), inseminated twice (T2, n=12), and inseminated 3 or more times (T3, n=11) according to the insemination numbers at the end of the study. The study was supported by Ataturk University Scientific Research Projects Coordination Unit (project code PRJ2015/302) and the research was approved by Ataturk University Veterinary Faculty Sub-Ethics Committee (AÜVFEAK; decision dated 13.07.2015 and numbered 2015/9). The content of the ration given to the animals used in the study is given in Table 1.

Collection of Samples

Blood samples were taken from all animals in the study on the 14th day before calving, within 2 hours after calving, and on the 7th, 14th and 21st days after calving, from the vena jugularis before feeding in the morning after milking into 10 ml vacuum tubes without anticoagulant. The blood samples taken were centrifuged at 4000 rpm at +4 °C for 10 minutes in a centrifuge device and their serum was removed. The serums were portioned into eppendorf tubes and stored in a deep freezer at -80 °C until analysis.

ELISA Analysis

AMH levels in serum samples obtained from the study groups were measured with the Anti-Mullerian Hormone (Elabscience Biotechnology Co., Ltd. United States) kit (Catalog No: E-EL-H0317) according to manufacturer's protocol using the Sandwich-ELISA method. In the package insert, the analytical sensitivity of the kit was reported as 56.25 pg.ml⁻¹ and the detection range as 93.75-6000 pg.ml⁻¹. β -hydroxybutyrate levels in serum samples obtained from study groups were studied with the Bovine Beta-Hydroxybutyric Acid (Sunlong Biotech Co., Ltd. China) kit (Catalog No: SL0027Bo) according to manufacturer's protocol using the Sandwich-ELISA method. In the package insert, the analytical sensitivity of the kit was reported as 0.05 μ g.ml⁻¹ and the detection range as 0.3-18 μ g.ml⁻¹. The terms "expression time" and "insemination*time" refer to the number of inseminations and the sampling time, respectively.

Spectrophotometric Analysis

Serum cholesterol (Catalog No: 1 1350 99 10 021), calcium (Catalog No: 1 1130 99 10 021), magnesium (Catalog No: 1 4610 99 10 021), phosphorus (Catalog No: 1 5211 99 10 021), total protein (Catalog No: 1 2311 99 10 021), triacylglycerol (Catalog No: 1 5760 99 10 021) and free glycerol (Catalog No: 1 5730 99 10 730) levels were measured using spectrometry (μ Quant, Bio-Tek Instruments, USA) with commercial

kits purchased from DiaSys Diagnostic Systems (Germany).

Chromatographic Analysis

Serum lipid profile analysis was performed using the High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) method. 1 ml of n-hexane/iso-propanol [2:1 (v/v)] mixture was added to 1 ml of serum and centrifuged at 2000 rpm for 15 minutes at +4 °C. The shaken serum tubes were centrifuged at 8000 rpm for 10 minutes and the supernatant was loaded onto 20x10 cm "Silica Gel 60" HPTLC plates. Plates were 7 cm in a mixture of hexane: diethylether: acetic acid [80:20:2 (v/v/v)] was carried out and dried at room temperature. CuSO₄ 3% in H₃PO₄ 8% was sprayed on these dried plates and burned in an oven at 180 °C for about 10 minutes, making the lipid bands visible (Cengiz et al. 2016).

After HPTLC plates were scanned at 600 dpi resolution in Epson Perfection V500 photo scanner, the area covered by the lipid bands of each sample was determined using Phoretix 1D (TL120) software and expressed as % of the total mixture.

Electrophoretic Analysis

In this research, only the T3 group of electrophoresis samples were analyzed. The method developed by (Laemmli 1970) was used to determine the protein profile in blood samples. For this purpose, samples were dissolved in Laemmli sample buffer and proteins were separated in 10% Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE).

After electrophoresis, the gels were stained with oriole, visualized with the GE LAS500 imaging system and analyzed with the Phoretix 1D (TL120) gel analysis program. The molecular weights of the displayed serum proteins were automatically calculated according to the above principle with the Phoretix 1D (TL 120) program available from Nonlinear Dynamics.

Statistical Analysis

All obtained data were analyzed using SAS 2009 (Statistical Analysis System, Version 9.0, 2002, Cary, NC, USA) package program. Because of the data were not categorical, they were subjected to one-way analysis of variance. The following linear model was created using the Proc. GLM (General Linear Model) procedure:

$Y_{ij} = \mu + Z_i + e_{ij}$, $Z =$ time (days) relative to the i th seeding and $e =$ error of the i and j th value. Differences over time were determined with the LSD (Least Square Differences) option. The values of the parameters by days were presented as mean \pm SE (standard error) and differences were considered significant at the $p < 0.05$ level.

RESULTS

ELISA Results

As serum AMH concentrations were examined, it was determined that the effect of number of insemination, sampling time and insemination*time were statistically significant ($p < 0.001$). After parturition, AMH levels increased in the T1 group, whereas they decreased in the T2 and T3 groups. It was detected that it decreased until the 7th day after parturition in all 3 groups, started to increase after the 7th day in the T1 group, after the 14th day in the T2 group, and decreased until the 21st day in the T3 group.

A sharp rise after parturition followed by a gradual decline was detected in BHB concentrations, which increased until the 7th day after parturition. While the group with the highest concentration was T3, the concentrations of T1 and T2 groups were found to be similar to each other. It was determined that the effect of insemination number, sampling time an semination*time on BHB concentrations were statistically significant ($p < 0.001$).

Spectrophotometric Results

The mean values of the spectrophotometrically measured parameters and their variation according to the time of parturition are presented in Table 2 and

Figure 1. Accordingly, it was determined that calcium concentration decreased with parturition, but started to increase after parturition. Calcium concentration was highest in T1 group before the parturition and lowest in T3 group during parturition ($p < 0.001$).

It was found that the phosphorus concentration decreased with parturition, but increased until the 14th day after parturition, after which it started to decrease again. The highest concentration was detected in the T1 group after parturition, while the lowest concentration was in the T2 group during parturition. Insemination number and sampling time were found to be statistically significant ($p < 0.001$).

Total Chol amount decreased excessively with delivery but started to increase afterwards, serum total Chol levels exceeded prepartum total Chol levels on postpartum 21st day, and the highest total Chol level was found in T3 group after parturition, the lowest the total Chol level was found to be in the T1 group during parturition ($p < 0.001$).

Change in total protein concentration is limited until parturition, but decreases significantly with parturition. While the decrease in total protein level continued until the postpartum 21st day in the T3 group, T1 (7.33 ± 0.15 mg.dl⁻¹) and T2 groups started to increase from the 14th day ($p < 0.001$). It was determined that the number of insemination and time-dependent sampling were statistically significant ($p < 0.001$) in total protein concentrations.

In blood magnesium concentrations, T1 was the group with the highest value, while the group with the lowest value was T3. It was determined that Mg, which increased with parturition, started to decrease after parturition. While the decrease continued in the T3 group, an increase was detected in the T1 and T2 groups starting from the 14th day ($p < 0.001$). While the effect of insemination*time was statistically insignificant ($p > 0.05$), it was determined that there was a statistically significant difference ($p < 0.001$) among

the groups when the effect of sampling time on insemination numbers was taken into account.

Serum TAG concentrations, which decreased until the 7th day after parturition, increased again after the 7th day. The highest TAG concentration was determined in T1 group 14th day before the parturition, and the lowest TAG concentration was determined in T3 group 14th after before the parturition ($p < 0.001$). As serum TAG levels are examined, it is seen that the number of inseminations is statistically insignificant ($p > 0.05$), while the effect of sampling time and insemination*time is statistically significant ($p < 0.001$).

As the free glycerol concentrations were examined, a large increase was determined with parturition and then a gradual decrease to a value close to the prepartum concentrations was detected. The highest free glycerol concentration was detected in the T3 group during parturition, and the lowest in the T1 group before the parturition. It was determined that the effect of insemination, sampling time and insemination*time were statistically significant ($p < 0.001$) on the groups.

Chromatographic Results

The mean values of the spectrophotometrically measured parameters and their variation according to the time of parturition have been presented in Table 3 and Figure 3. In addition HPTL chromatogram of T3 group serum lipid classes have been showed in Figure 2. As the cholesterol ester (CholE) ratio in serum total fat was examined, it was determined that the ratio was increasing starting from the prepartum period until the postpartum 14th day. After the 14th day, the CholE ratio started to decrease in the T1 and T2 groups, but continued to increase in the T3 group ($p < 0.001$). In the statistical evaluation, the effect of insemination number, sampling time and insemination*time was determined as ($p < 0.001$).

It was determined that the TAG ratio decreased at varying rates starting from calving until

the 14th day after calving. The greatest reduction was determined in the T3 group, and the lowest in the T1 group ($p < 0.001$). As the effect of insemination number, sampling time and insemination*time were evaluated statistically, it was found to be significant ($p < 0.001$).

As the variation of the free fatty acid (FFA) ratio according to the days at the time of calving was examined, it was determined that there was a gradual decrease from the 14th day before calving until the 14th day after calving. From the 14th day after calving, the FFA ratio increased in the T1 and T2 groups, while it continued to decrease in the T3 group. As evaluated statistically, the change between groups according to sampling time is significant ($p < 0.001$).

As Chol ratio was examined, a large change was determined. There was no difference in cholesterol ratio between the groups. In the statistical evaluation, the effect of insemination number, sampling time, and insemination*time was determined as insignificant ($p > 0.05$).

While diacylglycerol (DAG) ratio followed a constant course from the 14th day before calving to the 21st day after calving in the T1 and T2 groups, a gradual decrease was detected in the T3 group starting from the prepartum period. It was determined that the number of insemination, sampling time and the effect of insemination*time were statistically significant on the groups ($p < 0.001$).

As the phospholipid ratio was examined, it was found that the T1 and T2 groups were close to each other, and the T3 group was higher than these two groups ($p < 0.001$). It was determined that the effect of insemination number and insemination*time were statistically significant ($p < 0.001$) on the groups.

Electrophoretic Results

The SDS-PAGE analysis of serum samples showed the presence of 24 proteins between 361 and 15 kDa (Figures 4 and 5 and Table 4).

Table 1. The content of the ration given to the study animals

	Dry Matter Amount, kg
Meadow Grass	2.50
Triticale Silage	4.00
Corn Silage	4.50
Triticale grain	0.89
Milk Feed	8.54
HP	14.06
Energy	2438
DM %	53.04

Table 2. ELISA and Spectrophotometer results of blood samples taken on the 14th day before parturition, at the time of parturition and on the 7th, 14th and 21st days after parturition.

	Day	T1 $\bar{x}\pm SE$	T2 $\bar{x}\pm SE$	T3 $\bar{x}\pm SE$	Number of Insemination	Time	Insemination *Time
AMH (pg.ml ⁻¹)	-14	3217±69	2835.00±100.75	2487.27±94.89			
	0	2333.08	2566.67±111.51	2125.45±103.52			
	7	2024±62	1973.33±93.30	1846.36±77.88			
	14	2036±112.01	1878.33±126.59	1694.55±111.14			
	21	2669±80.84	2086.67±83.22	1568.18±47.97			
			2456±90.11 ^a	2268.00±103.07 ^b	1944.36±87.08 ^c	<0.001	<0.001
BHB (µg.ml ⁻¹)	-14	0.31±0.01	0.28±0.01	0.36±0.01			
	0	0.36±0.01	0.40±0.01	0.38±0.01			
	7	0.62±0.02	0.65±0.02	0.68±0.01			
	14	0.49±0.02	0.47±0.01	0.59±0.01			
	21	0.39±0.01	0.46±0.01	0.52±0.03			
			0.43±0.01 ^b	0.45±0.01 ^b	0.51±0.01 ^a	<0.001	<0.001
Calcium (mg.dl ⁻¹)	-14	8.73±0.11	8.39±0.24	8.98±0.15			
	0	5.67±0.07	5.04±0.15	4.85±0.13			
	7	6.29±0.09	6.70±0.21	6.29±0.19			
	14	6.40±0.14	6.82±0.18	6.46±0.14			
	21	7.87±0.19	7.57±0.08	7.32±0.14			
			6.99±0.10 ^a	6.90±0.17 ^{ab}	6.78±0.15 ^b	>0.05	<0.001
Phosphorus (mg.dl ⁻¹)	-14	5.79±0.20	4.91±0.33	5.51±0.13			
	0	3.94±0.12	3.43±0.21	3.76±0.13			
	7	5.55±0.18	4.67±0.31	5.57±0.26			
	14	6.19±0.24	5.72±0.18	6.00±0.14			
	21	5.97±0.29	5.45±0.15	5.75±0.14			
			5.49±0.21 ^a	4.83±0.23 ^b	5.32±0.15 ^a	<0.001	<0.001
Magnesium (mg.dl ⁻¹)	-14	1.97±0.06	1.82±0.11	1.99±0.08			
	0	2.72±0.11	2.55±0.15	2.78±0.12			
	7	2.24±0.07	2.05±0.13	2.26±0.11			
	14	1.96±0.07	1.84±0.12	2.02±0.09			
	21	2.16±0.05	2.16±0.05	2.04±0.07			
			2.21±0.07 ^a	2.09±0.11 ^b	2.22±0.09 ^a	>0.05	<0.001
Total cholesterol (mg.dl ⁻¹)	-14	83.46±2.79	93.58±4.31	112.91±5.36			
	0	45.88±3.04	59.58±4.20	67.75±3.21			
	7	73.86±4.51	104.40±5.18	119.32±6.31			
	14	100.50±3.86	115.58±4.95	146.09±5.86			
	21	131.63±4.38	130.45±5.06	172.33±5.07			
			87.07±3.72 ^c	100.72±4.74 ^b	123.68±5.16 ^a	<0.001	<0.001
Total protein	-14	7.82±0.15	7.78±0.29	7.44±0.24			
	0	7.58±0.16	7.23±0.24	7.31±0.31			

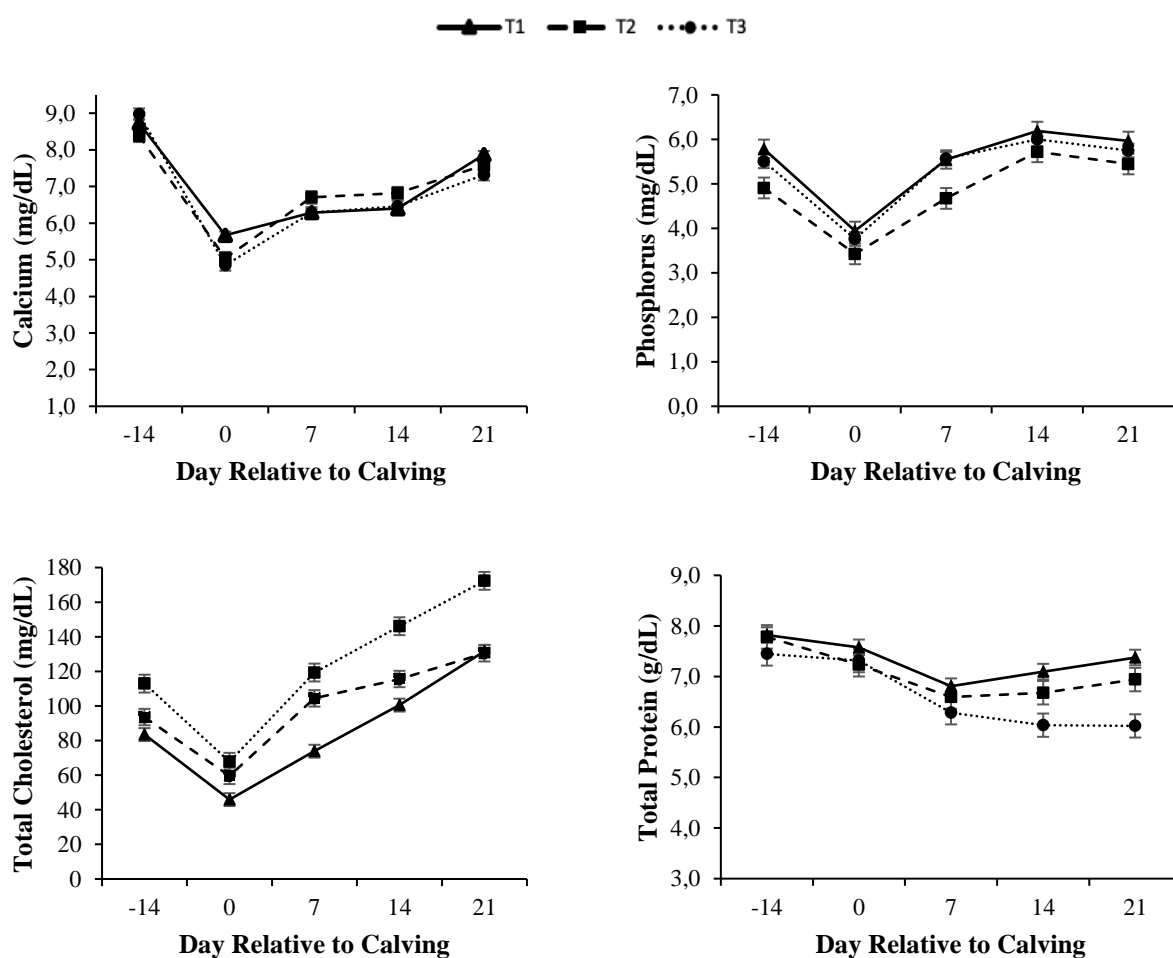
(g.dl ⁻¹)	7	6.81±0.21	6.59±0.28	6.28±0.27			
	14	7.09±0.13	6.68±0.20	6.04±0.15			
	21	7.37±0.11	6.94±0.15	6.02±0.17			
		7.33±0.15 ^a	7.04±0.23 ^b	6.62±0.23 ^c	<0.001	<0.001	>0.05
Triacylglycerol (mg.dl ⁻¹)	-14	32.62±2.29	28.92±2.28	23.64±1.38			
	0	19.69±1.64	16.25±1.69	12.91±1.21			
	7	14.17±1.28	13.29±1.58	11.91±1.35			
	14	16.05±1.53	13.09±1.09	11.41±1.01			
	21	19.85±1.98	16.00±1.50	13.27±1.30			
	20.47±1.82 ^a	17.51±1.63 ^b	14.63±1.25 ^c	<0.001	<0.001	>0.05	
Free glycerol (mg.dl ⁻¹)	-14	91.88±0.57	84.56±1.15	11284±238			
	0	295.35±408	312.10±3.33	32434±2.72			
	7	222.03±1.55	226.61±5.03	247.29±4.71			
	14	144.78±2.94	164.55±5.01	194.14±5.10			
	21	103.96±2.61	126.85±4.64	159.26±4.62			
	171.60±2.35 ^c	183.53±3.83 ^b	207.58±3.91 ^a	<0.001	<0.001	<0.001	

* Different exponential letters in the same line indicate the difference between groups (p<0.05).

T1: Inseminated once in the next insemination period

T2: Inseminated 2 times in the next insemination period

T3: Inseminated 3 or more times in the next insemination period



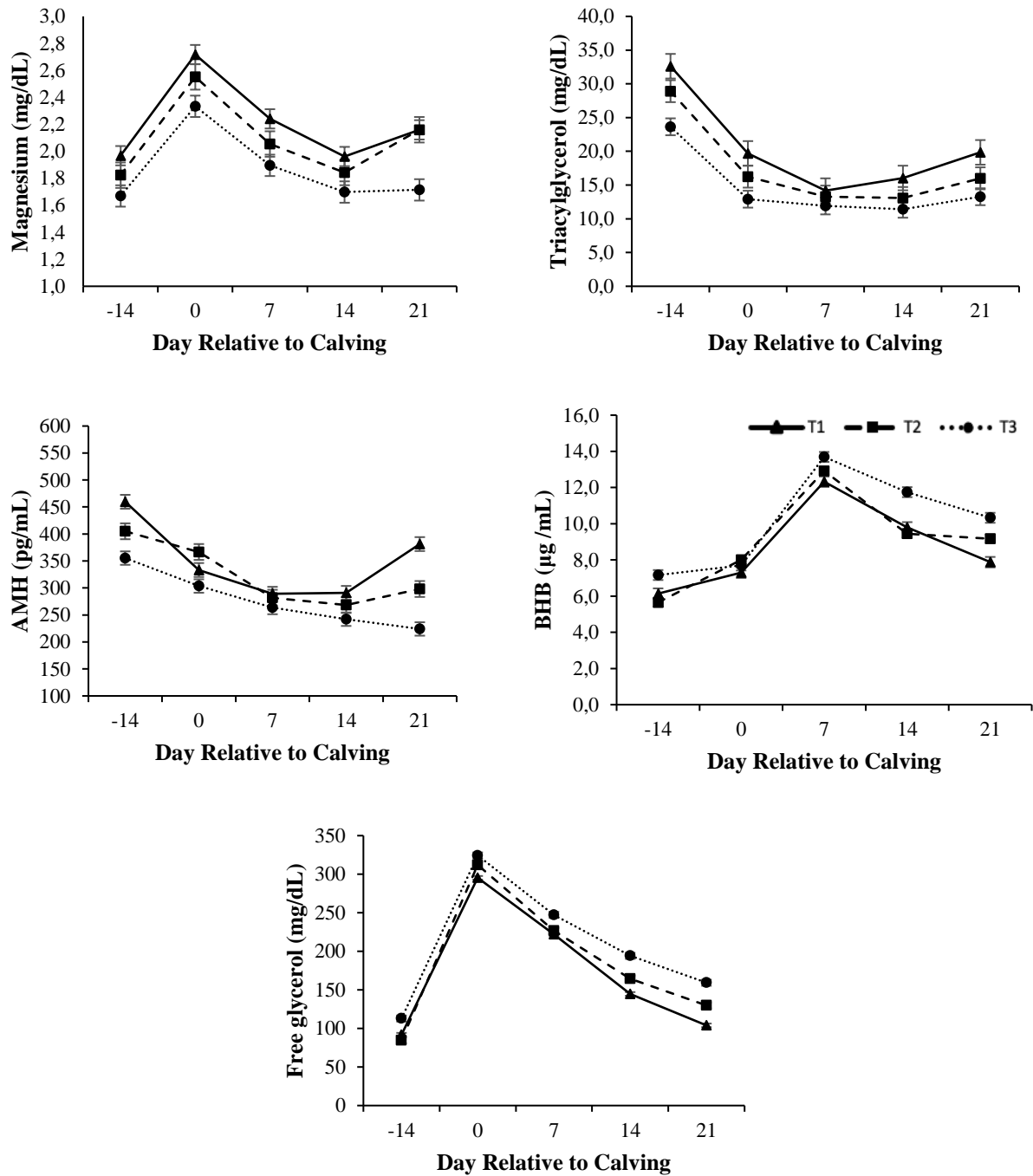


Figure 1. Variation of spectrophotometrically measured parameters according to day relative to calving

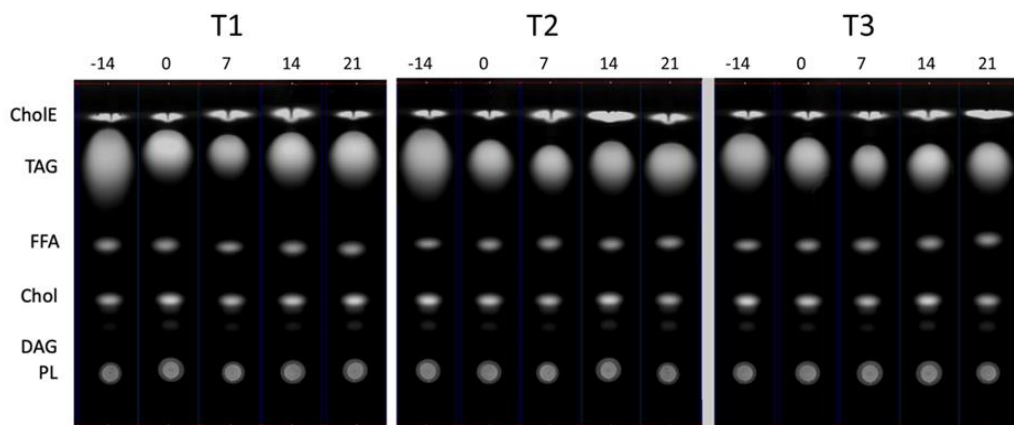


Figure 2. HP-TLC chromatogram of T1, T2, and T3 group serum lipid classes.

Table 3. HPTLC analyzes of blood samples taken on the 14th day before parturition, at the time of parturition and on the 7th, 14th and 21st days after parturition.

	Day	T1 $\bar{x} \pm SE$	T2 $\bar{x} \pm SE$	T3 $\bar{x} \pm SE$	Number of Insemination	Time	Insemination *Time
Cholesterol ester, %	-14	23.79±0.41	23.44±0.46	24.07±0.42			
	0	27.24±0.35	27.77±0.27	30.19±0.34			
	7	29.63±0.40	31.53±0.29	33.82±0.38			
	14	31.13±0.43	32.87±0.38	35.67±0.31			
	21	29.03±0.36	30.35±0.28	35.94±0.31			
			28.16±0.80 ^c	29.09±1.02 ^b	31.94±1.39 ^a	<0.001	<0.001
TAG, %	-14	24.90±0.43	23.98±0.40	24.18±0.47			
	0	20.83±0.30	20.01±0.34	18.46±0.39			
	7	18.74±0.29	17.00±0.31	14.10±0.24			
	14	17.75±0.30	15.85±0.34	12.72±0.28			
	21	19.22±0.34	17.85±0.32	12.21±0.28			
			20.29±0.77 ^a	18.94±0.90 ^b	16.33±1.41 ^c	<0.001	<0.001
FFA, %	-14	10.35±0.19	10.42±0.23	10.09±0.25			
	0	8.92±0.13	9.77±0.15	9.54±0.16			
	7	8.92±0.10	9.47±0.14	8.67±0.15			
	14	8.78±0.10	8.91±0.17	8.83±0.19			
	21	9.08±0.15	9.34±0.15	8.45±0.19			
			9.21±0.21 ^a	9.58±0.22 ^b	9.12±0.26 ^c	<0.001	<0.001
Free Cholesterol, %	-14	13.26±0.21	13.52±0.26	12.89±0.23			
	0	14.70±0.21	13.47±0.22	14.66±0.21			
	7	14.63±0.20	14.75±0.24	14.37±0.20			
	14	14.73±0.23	14.86±0.18	14.21±0.23			
	21	14.71±0.15	14.23±0.20	14.37±0.23			
			14.41±0.25 ^a	14.16±0.27 ^{ab}	14.10±0.27 ^b	>0.05	<0.001
DAG, %	-14	2.47±0.04	2.79±0.05	2.56±0.05			
	0	2.45±0.04	2.39±0.03	2.45±0.04			
	7	2.42±0.03	2.40±0.03	1.89±0.03			
	14	2.51±0.04	2.55±0.04	1.50±0.04			
	21	2.48±0.03	2.56±0.05	1.32±0.03			
			2.47±0.04 ^b	2.54±0.06 ^a	1.94±0.16 ^c	<0.001	<0.001
Phospholipid, %	-14	25.22±0.40	25.85±0.34	25.40±0.46			
	0	25.87±0.37	26.59±0.29	24.69±0.30			
	7	25.66±0.34	24.85±0.27	27.16±0.33			
	14	25.09±0.31	25.09±0.32	27.06±0.35			
	21	25.48±0.33	25.67±0.28	27.70±0.35			
			25.47±0.35 ^b	25.61±0.34 ^b	26.40±0.49 ^a	<0.001	>0.05

* Different exponential letters in the same line indicate the difference between groups ($p < 0.05$).

T1: Inseminated once in the next insemination period

T2: Inseminated 2 times in the next insemination period

T3: Inseminated 3 or more times in the next insemination period

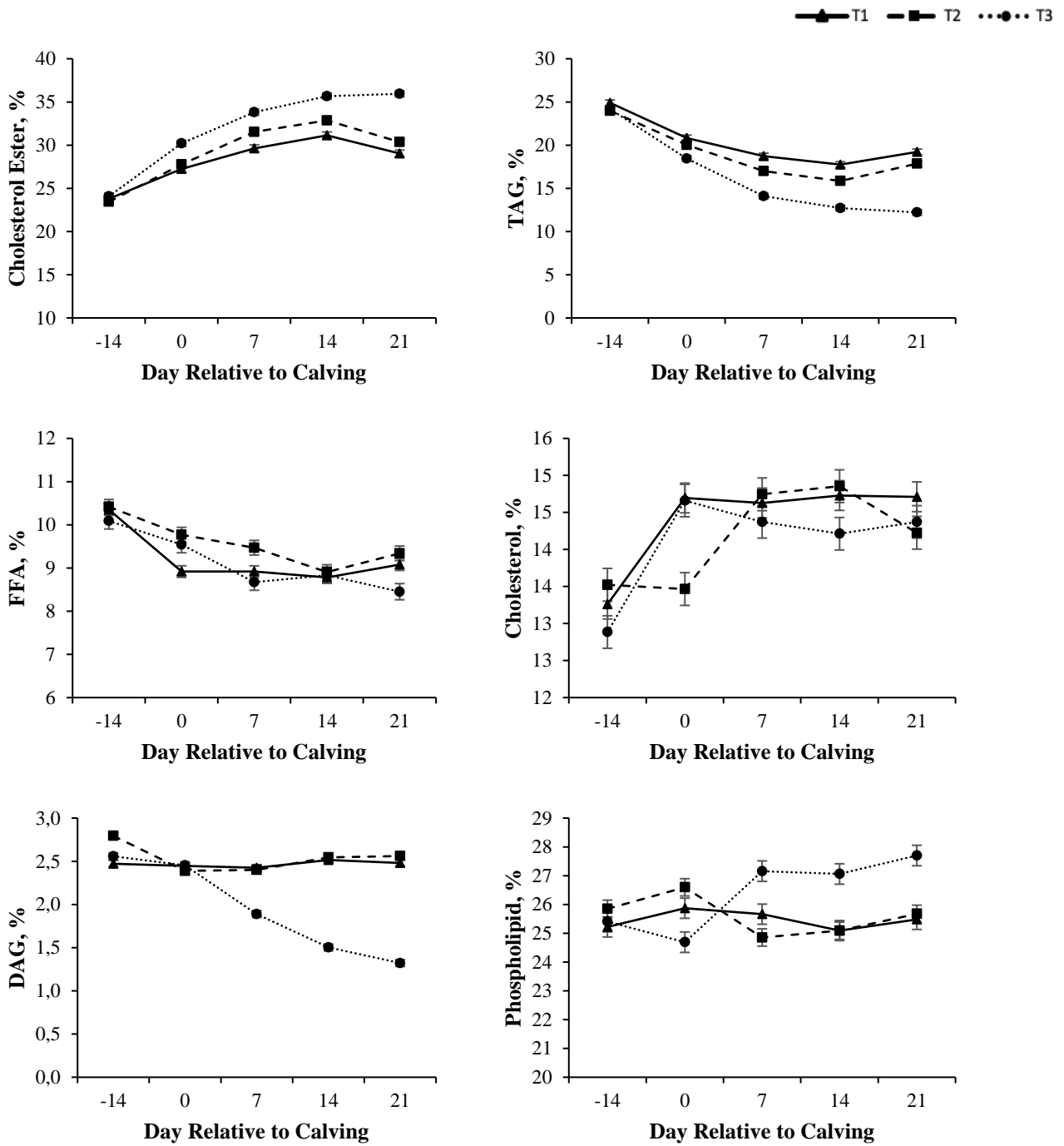


Figure 3. Variation of chromatographically measured parameters according to day relative to calving

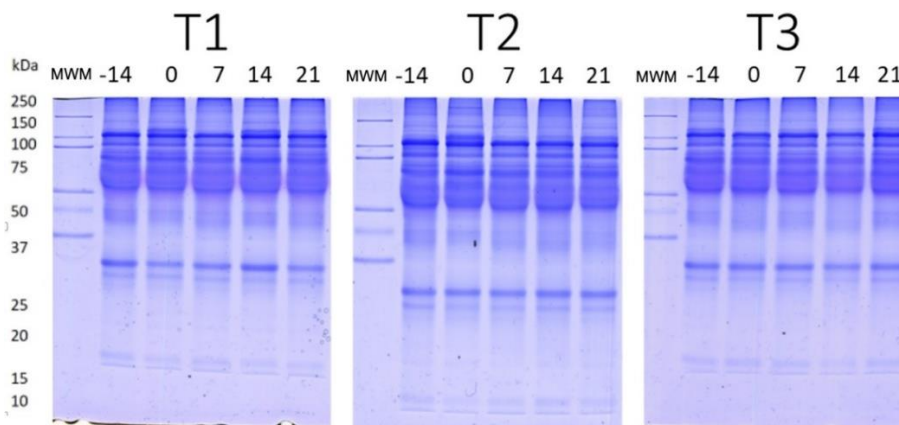
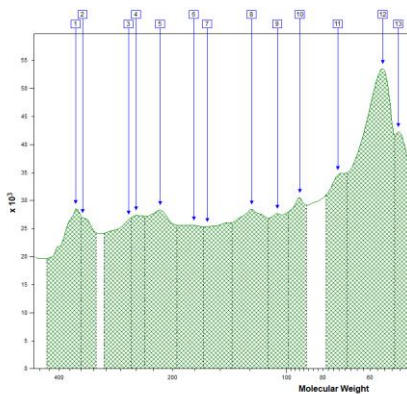


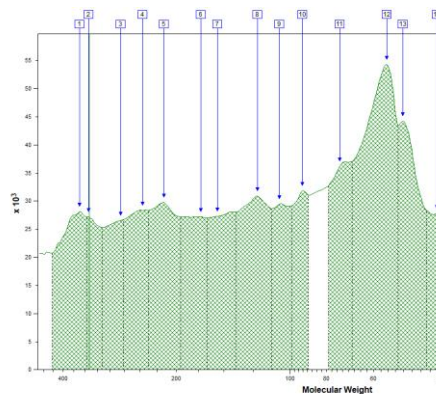
Figure 4. SDS-PAGE electrophoretogram of T1, T2, and T3 group serum protein classes.

Table 4. Quantities (volume) of individual proteins in the T3 group serum total protein.

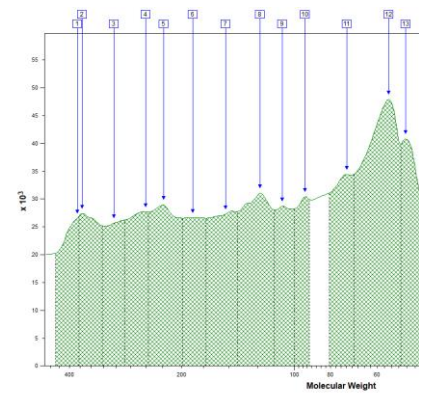
MA (kDa)	Day									
	-14		0		7		14		21	
	Volum	Band %	Volum	Band %	Volum	Band %	Volum	Band %	Volum	Band %
361	501	4.6	485	4.00	253	2.18	283	2.51	188	1.76
346	212	1.72	194	1.60	323	2.79	135	1.20	159	1.49
261	305	2.47	238	1.97	260	2.25	291	2.58	237	2.22
250	138	1.12	255	2.10	249	2.16	237	2.10	279	2.62
215	276	2.24	264	2.18	256	2.22	224	1.99	240	2.25
176	207	1.68	200	1.65	195	1.69	166	1.47	178	1.67
162	233	1.89	228	1.88	248	2.15	292	2.59	202	1.89
123	444	3.60	435	3.59	431	3.73	388	3.44	398	3.73
105	360	2.92	348	2.87	339	2.93	332	2.94	303	2.84
92	356	2.88	310	2.56	273	2.36	297	2.64	246	2.30
73	510	4.14	556	4.59	582	5.03	492	4.37	472	4.42
55(Albumin)										
)	2502	20.28	2297	18.94	2052	17.75	2189	19.42	1963	18.39
50	1551	12.57	1504	12.4	1426	12.33	1458	12.94	1500	14.05
41	750	6.08	772	6.36	738	6.38	691	6.13	599	5.62
36	423	3.43	462	3.81	414	3.58	496	4.40	391	3.67
33	407	3.30	415	3.42	470	4.06	347	3.08	372	3.48
29	465	3.77	495	4.08	435	3.76	387	3.43	403	3.77
26	1005	8.14	922	7.60	890	7.69	896	7.95	899	8.42
24	369	2.99	467	3.85	372	3.21	408	3.62	340	3.18
20	510	4.13	449	3.70	578	5.00	579	5.13	578	5.41
18	532	4.31	541	4.46	485	4.19	429	3.81	413	3.87
15	282	2.28	291	2.40	296	2.56	255	2.26	314	2.94
Total										
*100000	12337	100	12127	100	11564	100	11271	100	10674	100



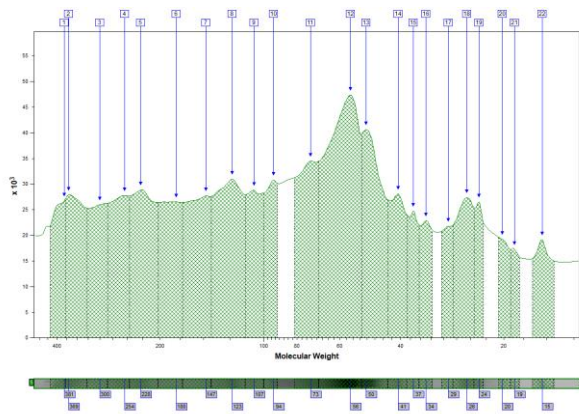
SDS-PAGE densitogram of T3 group serum protein classes 14 days before the parturition



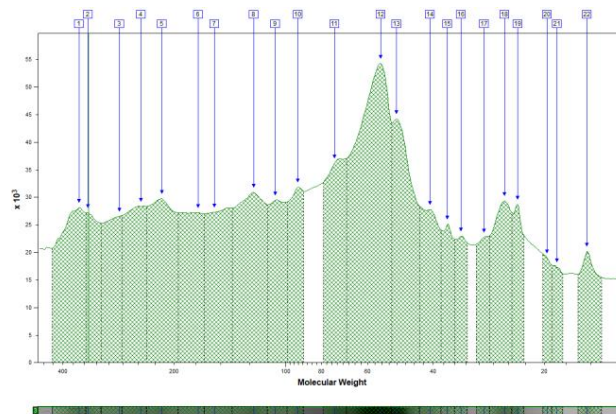
SDS-PAGE densitogram of parturition time T3 group serum protein classes



SDS-PAGE densitogram of T3 group serum protein classes 7 days after parturition



SDS-PAGE densitogram of T3 group serum protein classes 14 days after parturition



SDS-PAGE densitogram of T3 group serum protein classes 21 days after parturition

Figure 5. SDS-PAGE densitogram of T3 group serum protein classes.

Table 5. The correlation between parameters.

	CholE. %	TAG.%	FFA.%	Chol.%	DAG.%	Pl.%	Ca (mg.dl ⁻¹)	TP (g.dl ⁻¹)	TAG (mg.dl ⁻¹)	P (mg.dl ⁻¹)	Mg (mg.dl ⁻¹)	Ghol (mg.dl ⁻¹)	AMH (pg.ml ⁻¹)	BHB (µg.ml ⁻¹)	F. Glycerol (mg.dl ⁻¹)
CholE	1	-0.942**	-0.596**	0.317**	-0.670**	0.184*	0.012	-0.246**	-0.297**	-0.034	-0.096	0.462**	-0.323**	0.111	-0.007
TAG. %		1	0.601**	-0.407**	0.702**	-0.336**	-0.015	0.274**	0.301**	0.035	0.078	-0.478**	0.352**	-0.148*	-0.016
FFA. %			1	-0.253**	0.464**	-0.366**	0.047	0.250**	0.252**	-0.097	0.000	-0.333**	0.320**	-0.179*	-0.007
Chol. %				1	-0.077	-0.194**	-0.023	-0.120	-0.163*	-0.018	-0.091	0.150*	-0.173*	0.077	0.010
DAG. %					1	-0.490**	0.010	0.221**	0.116	-0.034	0.015	-0.329**	0.214**	-0.067	-0.015
Pl. %						1	-0.008	-0.133	-0.079	-0.002	0.093	0.127	-0.154*	0.080	0.058
Ca (mg.dl ⁻¹)							1	0.243**	0.494**	0.440**	-0.360**	0.376**	0.409**	-0.315**	-0.845**
TP (g.dl ⁻¹)								1	0.376**	-0.117	0.114	-0.297**	0.528**	-0.493**	-0.097
TAG (mg.dl ⁻¹)									1	0.042	-0.121	-0.126	0.571**	-0.508**	-0.435**
P (mg.dl ⁻¹)										1	-0.376**	0.553**	-0.122	0.164*	-0.566**
Mg (mg.dl ⁻¹)											1	-0.327**	0.009	-0.058	0.569**
Ghol (mg.dl ⁻¹)												1	-0.334**	0.283**	-0.469**
AMH (pg.ml ⁻¹)													1	-0.599**	-0.277**
BHB (µg.dl ⁻¹)														1	0.278**
F. Glycerol (mg.dl ⁻¹)															1

** Significance p<0.01

* Significance p<0.05

DISCUSSION

Transition health is an important indicator of the production and reproductive performance of dairy animals in later periods. In the periparturient period, deep endocrine changes occur to provide the energy need (Goff and Horst 1997). The main purpose of this study is to evaluate the correlation between the transition period serum concentration of AMH, which is one of the main factors in the regulation of follicle development, and the rate of pregnancy.

Anti-Müllerian hormone inhibits early primordial follicle activation in females. Deficiency of this hormone has been shown to cause early menopause in mice (Pereira et al. 2013). Individual AMH levels measured in serum and/or plasma have been shown to be consistent across oestrus cycles and correlated with FSH levels (Wang et al. 2009). As examined at the population level, AMH shows quite different levels among individuals with different ovarian potential (Ireland et al. 2008). Ovarian reserve estimated by AMH measurement generally reflects the total amount of oocytes present in the ovary (Ireland et al. 2011). In a previous study, AMH has been shown to be accurate when measured in serum at any stage of the oestrus cycle, regardless of the concentrations of other endocrine and paracrine reproductive hormones (La Marca et al. 2009).

In addition, AMH is a good prognostic tool for fertility and can be used to weed cattle to obtain a good dairy herd (Ireland et al. 2007). In this study, it was determined that the effect of serum AMH concentrations on the number of insemination, sampling time and insemination*time were statistically significant ($p < 0.001$). Based on these results, it can be said that cows that can reach postpartum AMH concentrations faster and higher in negative energy balance can become pregnant more easily in the next insemination.

β -hydroxybutyrate is the most stable ketone body that can be easily measured. Comparably FFA,

BHB reflects the NEB level in dairy cows in the transition period. It has been reported that an increase in the level of BHB in the blood to 1.4 mmol.l^{-1} is associated with an increased risk of metabolic disorders, while a level higher than 2.0 mmol.l^{-1} is associated with reduced milk yield (Duffield 2000). In addition, it has been suggested that BHB concentration is the golden marker for the diagnosis of ketosis in cattle (Kaneko et al. 2008). In a previous study, it was shown that serum BHB concentration between 1.0 and 3.0 mmol.l^{-1} is generally detected in dairy cows with subclinical ketosis, and concentrations less than 1 mmol.l^{-1} are normal (Li et al. 2016). It was determined that while the BHB levels of T1 and T2 of the groups in this study were at normal levels, the T3 group was in ketosis and the BHB level affected the number of inseminations.

Cholesterol levels may change due to the limitation of both lactation period and nutrient intake due to the demand for a large amount of biomolecules in colostrum-milk production with birth (Gross et al. 2015). In this study, lipid parameters of transitional cows were investigated both spectrophotometrically and chromatographically. As the lipid classes that make up the serum total fat are examined, it was found that the ratio of CholE in serum total fat increased continuously from the 14th day before birth until the 14th day after birth, it started to decrease from the 14th day after parturition in the T1 and T2 groups, but the increase continued in the T3 group. On the other hand, it was detected that the ratio of free Chol in serum total fat did not change during the transition period, but the total amount of Chol increased with birth in the T1 and T3 groups, and on the 7th postnatal day in the T2 group. In the presented study, it was determined that the free Chol ratio did not change relatively, but the total Chol level increased chromatographically. It suggests that the decrease in TAG ratio in serum total fat suppresses the decrease in serum free Chol ratio,

and that the increase in serum total Chol level may be caused by excessive CholE ratio, not free Chol.

Free fatty acid concentration is less than 0.2 mM on average in dairy cows during early pregnancy and late lactation and reaches a concentration above 0.7 mM by 10 days postpartum (Adewuyi et al. 2005). FFA concentration in the transition period was higher than after the transition period. In the present study, it was determined that the TAG ratio in serum total fat decreased continuously from the 14th day before calving until the 14th day after calving, it started to increase from the 14th day in the T1 and T2 groups, but the decrease continued in the T3 group, and the lowest TAG level was in the T3 group. It was determined that the DAG ratio of the lipolysis product remained relatively unchanged in the T1 and T2 groups, and decreased in the T3 group until the postpartum 21st day, while the PL ratio fluctuated according to the groups and time. It was determined that the rate of FFA, another lipolysis product, decreased with calving, there was no postpartum decrease in the T1 group, the decrease stopped on the 7th postpartum day in the T2 and T3 groups, and started to decrease again on the 14th postpartum day in the T3 group. Contrary to the general literature, consistent with (Van der Drift et al. 2012) the decreased FFA concentration we detected in the transition period suggested that it may be due to increased intake, FFAs are rapidly removed from the circulation to meet the excess energy need by β -oxidation, taken up by the peripheral tissues and/or produced by the mammary gland for milk fat synthesis. In our study, we found that the PL ratio in serum total fat increased contrary to the literature. This increase suggests that the excessive decrease in TAG ratio in serum total fat masks the decrease in serum PL ratio due to the pressure on lipolysis and/or lipogenesis, as in free Chol.

The homeostatic mechanisms controlling the blood calcium concentration are generally not able to

respond quickly enough to provide the sudden increase in calcium demand with calving in periparturient dairy cows. As a result, clinical and subclinical hypocalcemia occurs in dairy cows. Some researchers found no association between clinical hypocalcemia and reproductive outcomes in line with our study (Eicker et al. 1996). Other studies have shown lower reproductive outcomes in cows with clinical hypocalcemia, including a prolonged interval to first ovulation, a longer luteal phase after first ovulation, impaired ovarian cyclicity, and increased times to both first insemination and attachment (Risco et al. 1994, Whiteford and Sheldon 2005).

Hypophosphatemia is commonly encountered in the transition period of dairy cows (Macrae et al. 2006). The clinical significance of this electrolyte imbalance remains unclear and has been discussed for many years. Empirical evidence suggests that hypophosphatemia or phosphorus deficiency in young cows can cause or at least contribute to diseases such as underlying cow syndrome or postpartum hemoglobinuria in dairy cows (Grünberg 2014, Ménard and Thompson 2007). Although hypophosphatemia has been investigated in transitional cows, its effects on fertility are still not understood. In our study, it was determined that phosphorus concentration decreased until calving and returned to its former levels with parturition. As a result of the statistics, it was determined that this phosphorus change contributed significantly to the next insemination period of the cows ($p < 0.001$).

Low Mg levels in plasma affect Ca metabolism by reducing parathormone (PTH) secretion or tissue sensitivity in response to hypocalcemia. Magnesium concentration in colostrum is approximately three times higher than in normal milk and has been shown to rapidly cause hypomagnesemia in lactating cows if the extracellular magnesium used for milk production is not resupplied (Goff 2006, Tsioulpas et al. 2007). Our results reveal that transitional serum magnesium

concentrations are associated with reproductive performance in dairy cows. Thus, it is thought that the serum magnesium concentration during the transition period may serve as a biomarker for re-insemination in dairy cows. Preeclampsia has been associated with impaired maternal mineral homeostasis, particularly related to magnesium. However, it is likely that low serum magnesium concentrations in the peripartum period will increase the risk of fetal and placental involvement, since magnesium deficiency can lead to hyperexcitability caused by a decrease in nerve resting membrane potential.

Albumin and globulins all make up "total serum protein". In a study, it was reported that the amount of total protein decreased slightly calving the 4th day after birth, but increased until the 60th day after parturition (Gaona et al. 2012). On the other hand, it was stated that albumin concentration decreased during the transition period (Trevisi et al. 2015). In addition, (Djokovic et al. 2015) reported that serum albumin level indicates the synthetic capacity of the liver and tends to decrease in animals in early lactation. Similarly, one study reported low albumin levels, a high incidence of fatty liver - negative energy balance in transitional cows, indicating impaired liver function (Montagner et al. 2016). In our study, it was determined that the total protein was low until calving, but decreased significantly until the 7th day after calving, then increased in the T1 and T2 groups, whereas in the T3 group, the decrease stopped at the postnatal 14th day and did not increase even on the 21st postpartum day. As serum protein electrophoretograms were examined, it was determined that this decrease in protein level was the result of decreased expression of many serum proteins, including albumin, at different levels.

According to the data obtained, it was seen that serum AMH concentration was closely related to the parameters that reflect the energy balance of the cow - TP, TAG, BHB levels rather than mineral levels.

It was determined that cows with high prepartum AMH level and cows that came out of negative energy balance earlier were pregnant with less insemination number. In addition, in parallel with these results, it was concluded that the individual AMH levels of the cows in the herd can help the veterinarian about the insemination strategy, and may also be an indicator for making a decision about an animal in weeding.

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

Authors Contribution Rate: Mustafa İLERİTÜRK: %70, Özgür KAYNAR: %30

Ethical Approval: This study was approved by Ataturk University Veterinary Faculty Sub-Ethics Committee (AÜVFEAK; decision dated 13.07.2015 and numbered 2015/9).

Financial Support: The study was supported by Ataturk University Scientific Research Projects Coordination Unit (project code PRJ2015/302).

REFERENCES

- Adewuyi, A. A., Gruys, E., & Van Eerdenburg, F. J. C. M.** (2005). Non esterified fatty acids (NEFA) in dairy cattle. A review. *Veterinary quarterly*, 27(3), 117-126.
<https://doi.org/10.1080/01652176.2005.9695192>
- Batista, E. O. S., Macedo, G. G., Sala, R. V., Ortolan, M. D. D. V., Sá Filho, M. F. D., Del Valle, T. A., ... & Baruselli, P. S.** (2014). Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(3), 448-452.
<https://doi.org/10.1111/rda.12304>
- Bell, A. W.** (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of animal science*, 73(9), 2804-2819.
<https://doi.org/10.2527/1995.7392804x>
- Cengiz, M., Kaynar, O., Cannazik, O., İleritürk, M., Cengiz, S., & Hayırlı, A.** (2015). Sampling factors causing variability in milk constituents in early lactation cows. *Vet. Med-Czech*, 60, 6-15.
<https://doi.org/10.17221/7920-VETMED>
- Djoković, R., Cincović, M., Belić, B., Toholj, B., Davidov, I., & Hristovska, T.** (2015). Relationship between blood metabolic hormones, metabolites and energy balance in Simmental dairy cows during peripartum period and lactation. *Pak. Vet. J*, 35(2), 163-167.
- Drackley, J. K.** (1999). Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier?. *Journal of dairy science*, 82(11), 2259-2273.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75474-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75474-3)

- Drackley, J. K., Dann, H. M., Douglas, N., Guretzky, N. A. J., Litherland, N. B., Underwood, J. P., & Loor, J. J.** (2005). Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 4(4), 323-344.
<https://doi.org/10.4081/ijas.2005.323>
- Van der Drift, S. G. A., Houweling, M., Schonewille, J. T., Tielens, A. G. M., & Jorritsma, R.** (2012). Protein and fat mobilization and associations with serum β -hydroxybutyrate concentrations in dairy cows. *Journal of dairy science*, 95(9), 4911-4920.
<https://doi.org/10.3168/jds.2011-4771>
- Duffield, T.** (2000). Subclinical ketosis in lactating dairy cattle. *Veterinary clinics of north america: Food animal practice*, 16(2), 231-253.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30103-1](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30103-1)
- Eicker, S. W., Gröhn, Y. T., & Hertl, J. A.** (1996). The association between cumulative milk yield, days open, and days to first breeding in New York Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 79(2), 235-241.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(96\)76356-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(96)76356-7)
- Campos Gaona, R., García Alegría, K., Hernández, E. A., & Giraldo Patiño, L.** (2012). Protein and mineral metabolites for dairy cows during the transition period under tropical conditions. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 65(2), 6719-6728.
- Gobikrushanth, M., Dutra, P. A., Bruinje, T. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., & Ambrose, D. J.** (2017). Repeatability of antral follicle counts and anti-Müllerian hormone and their associations determined at an unknown stage of follicular growth and an expected day of follicular wave emergence in dairy cows. *Theriogenology*, 92, 90-94.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.01.018>
- Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., Wang, Z., & Ambrose, D. J.** (2018). The relationship between serum anti-Müllerian hormone concentrations and fertility, and genome-wide associations for anti-Müllerian hormone in Holstein cows. *Journal of dairy science*, 101(8), 7563-7574.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13940>
- Goff, J. P.** (2006). Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Animal feed science and technology*, 126(3-4), 237-257.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.005>
- Goff, J. P., & Horst, R. L.** (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of dairy science*, 80(7), 1260-1268.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76055-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7)
- Gross, J. J., Kessler, E. C., Albrecht, C., & Bruckmaier, R. M.** (2015). Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PloS one*, 10(6), e0121956.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121956>
- Grummer, R. R.** (1995). Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *Journal of animal science*, 73(9), 2820-2833.
<https://doi.org/10.2527/1995.7392820x>
- Grummer, R. R., Mashek, D. G., & Hayirli, A.** (2004). Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 20(3), 447-470.
<https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2004.06.013>
- Grünberg, W.** (2014). Treatment of phosphorus balance disorders. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 30(2), 383-408. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2014.03.002>
- Ingvartsen, K. L.** (2006). Feeding-and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases. *Animal feed science and technology*, 126(3-4), 175-213.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.08.003>
- Ireland, J. J., Smith, G. W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., ... & Evans, A. C. O.** (2010). Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 1-14.
<https://doi.org/10.1071/RD10226>
- Ireland, J. J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Lonergan, P., & Evans, A. C. O.** (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, 22(6), 1687-1695.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dem071>
- Ireland, J. L. H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A. P. N., Ward, F., Lonergan, P., ... & Ireland, J. J.** (2008). Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of reproduction*, 79(6), 1219-1225. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W., & Bruss, M. L.** (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. 6th edition. Academic Press.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- LeBlanc, S.** (2010). Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of reproduction and Development*, 56(S), S29-S35.
<https://doi.org/10.1262/jrd.1056S29>
- Li, Y., Ding, H. Y., Wang, X. C., Feng, S. B., Li, X. B., Wang, Z., ... & Li, X. W.** (2016). An association between the level of oxidative stress and the concentrations of NEFA and BHBA in the plasma of ketotic dairy cows. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 100(5), 844-851.
<https://doi.org/10.1111/jpn.12454>
- Macrae, A. I., Whitaker, D. A., Burrough, E., Dowell, A., & Kelly, J. M.** (2006). Use of metabolic profiles for the assessment of dietary adequacy in UK dairy herds. *Veterinary Record*, 159(20), 655-661.
<https://doi.org/10.1136/vr.159.20.655>
- La Marca, A., Broekmans, F. J., Volpe, A., Fauser, B. C., & Macklon, N. S.** (2009). Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?. *Human reproduction*, 24(9), 2264-2275.
<https://doi.org/10.1093/humrep/dep210>
- La Marca, A., Sighinolfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Artesio, A. C., ... & Volpe, A.** (2010). Anti-Müllerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human reproduction update*, 16(2), 113-130.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dmp036>
- Ménard, L., & Thompson, A.** (2007). Milk fever and alert downer cows: Does hypophosphatemia affect the treatment response?. *The Canadian Veterinary Journal*, 48(5), 487.
- Montagner, P., Krause, A. R. T., Schwegler, E., Weschenfelder, M. M., Rabassa, V. R., Schneider, A., ... & Corrêa, M. N.** (2016). Reduction of liver function delays resumption of postpartum ovarian activity and

- alters the synthesis of acute phase proteins in dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 106, 84-88. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.015>
- Mossa, F., Carter, F., Walsh, S. W., Kenny, D. A., Smith, G. W., Ireland, J. L., ... & Evans, A. C.** (2013). Maternal undernutrition in cows impairs ovarian and cardiovascular systems in their offspring. *Biology of Reproduction*, 88(4), 92-1. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107235>
- Pereira, F. T. V., Oliveira, L. J., Barreto, R. D. S. N., Mess, A., Perecin, F., Bressan, F. F., ... & Meirelles, F. V.** (2013). Fetal-maternal interactions in the synepitheliochorial placenta using the eGFP cloned cattle model. *PLoS One*, 8(5), e64399. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064399>
- Putman, A. K., Brown, J. L., Gandy, J. C., Wisnieski, L., & Sordillo, L. M.** (2018). Changes in biomarkers of nutrient metabolism, inflammation, and oxidative stress in dairy cows during the transition into the early dry period. *Journal of dairy science*, 101(10), 9350-9359. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14591>
- Ribeiro, E. S., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Greco, L. F., Morrison, A., Kumar, A., ... & Santos, J. E. P.** (2014). Plasma anti-Müllerian hormone in adult dairy cows and associations with fertility. *Journal of Dairy Science*, 97(11), 6888-6900. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-7908>
- Rico, C., Fabre, S., Médigue, C., Clemente, N. D., Clément, F., Bontoux, M., ... & Monniaux, D.** (2009). Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biology of reproduction*, 80(1), 50-59. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.072157>
- Risco, C. A., Drost, M., Thatcher, W. W., Savio, J., & Thatcher, M. J.** (1994). Effects of calving-related disorders on prostaglandin, calcium, ovarian activity and uterine involution in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 42(1), 183-203. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90675-9](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90675-9)
- Van Saun, R. J.** (2016). Indikatoren für Risiken bei Kühen in der Transitphase—eine Übersicht zu metabolischen Profilen. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Großtiere/Nutztiere*, 44(02), 118-126. <https://doi.org/10.15653/TPG-150947>
- Souza, A. H., Carvalho, P. D., Rozner, A. E., Vieira, L. M., Hackbart, K. S., Bender, R. W., ... & Wiltbank, M. C.** (2015). Relationship between circulating anti-Müllerian hormone (AMH) and superovulatory response of high-producing dairy cows. *Journal of dairy science*, 98(1), 169-178. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8182>
- Trevisi, E., Jahan, N., Bertoni, G., Ferrari, A., & Minuti, A.** (2015). Pro-inflammatory cytokine profile in dairy cows: consequences for new lactation. *Italian Journal of Animal Science*, 14(3), 3862. <https://doi.org/10.4081/ijas.2015.3862>
- Tsioulpas, A., Grandison, A. S., & Lewis, M. J.** (2007). Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. *Journal of dairy science*, 90(11), 5012-5017. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0192>
- Turk, R., Juretic, D., Geres, D., Turk, N., Rekić, B., Simeon-Rudolf, V., & Svetina, A.** (2004). Serum paraoxonase activity and lipid parameters in the early postpartum period of dairy cows. *Research in Veterinary Science*, 76(1), 57-61. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2003.08.001>
- Wang, J., Dicken, C., Lustbader, J. W., & Tortoriello, D. V.** (2009). Evidence for a Müllerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertility and sterility*, 91(4), 1195-1203. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.028>
- Wankhade, P. R., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Ramesha, K. P., Sejian, V., ... & Varghese, M. R.** (2017). Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Veterinary world*, 10(11), 1367. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1367-1377>
- Whiteford, L. C., & Sheldon, I. M.** (2005). Association between clinical hypocalcaemia and postpartum endometritis. *The Veterinary Record*, 157(7), 202-204.

The Effects of Restraint and Cold Restraint Stress on Coagulation Indicators in Wistar Albino Rats

Çağlasu KOÇ¹, Mehmet EKİCİ^{2*}

¹3rd Year Student, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

²Department of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Sivas Cumhuriyet University, Sivas, Türkiye

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of restraint and cold restraint stress from acute stress protocols on coagulation indicators in rats. The study was conducted in 18 male Wistar albino rats aged 8-10 weeks with a body weight of 180-220 g. After a one-week adaptation period, the rats were randomly divided into three groups (n=6/group). The animals in the control group were not exposed to any stress. Rats in the restraint group were housed in restrainers designed for rats, and their movement was restricted for 2 hours at room temperature. Rats in the cold restraint group were kept in the restrainer at +4°C for 2 hours. Blood samples were collected by cardiac puncture under ketamine and xylazine anesthesia in Vacutainer® tubes containing 3.2% sodium citrate (0.109 M trisodium citrate). Coagulation indicators (aPTT, PT, INR, fibrinogen, and D-dimer) were analyzed using an automated analyzer (Roche Cobas t511, Switzerland). Although acute stress (restraint and cold restraint stress) had no effect on aPTT and D-dimer levels (p>0.05), it increased PT and INR values (p<0.05) and decreased fibrinogen concentration (p<0.05). Consequently, acute stress may lead to platelet hypofunction in rats by prolonging PT, increasing INR, and decreasing fibrinogen concentration.

Keywords: Acute stress, aPTT, D-dimer, Fibrinogen, INR, PT

Kısıtlama ve Soğuk Kısıtlama Stresinin Wistar Albino Sıçanlarda Pıhtılaşma Göstergeleri Üzerindeki Etkileri

ÖZ

Bu çalışmanın amacı, kısıtlama ve soğuk kısıtlama stresi gibi iki farklı akut stres protokolünün sıçanlarda pıhtılaşma göstergeleri üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışma, vücut ağırlığı 180-220 g olan, 8-10 haftalık 18 erkek Wistar albino sıçan üzerinde gerçekleştirildi. Bir haftalık adaptasyon sürecinden sonra sıçanlar rastgele üç gruba (n=6/grup) ayrıldı. Kontrol grubundaki hayvanlar herhangi bir strese maruz bırakılmadı. Kısıtlama grubundaki ratlar, ratlar için tasarlanmış kısıtlayıcı içinde barındırıldı ve oda sıcaklığında 2 saat hareketleri kısıtlandı. Soğuk kısıtlama grubundaki ratlar +4°C'de 2 saat kısıtlayıcı içinde tutuldu. Kan numuneleri, %3,2 sodyum sitrat (0.109 M trisodyum sitrat) içeren Vacutainer® tüplerine ketamin ve ksilazin anestezisi altında kardiyak punksiyon yoluyla toplandı. Pıhtılaşma göstergeleri (aPTT, PT, INR, fibrinojen ve D-dimer) otomatik bir analiz cihazı (Roche Cobas t511, İsviçre) kullanılarak analiz edildi. Akut stres (kısıtlama ve soğuk kısıtlama stresi) aPTT ve D-dimer düzeylerine etki etmezken (p>0.05), PT ve INR değerlerini artırdı (p<0.05), fibrinojen konsantrasyonunu düşürdü (p<0.05). Sonuç olarak akut stres, PT'yi uzatarak, INR'yi artırarak ve fibrinojen konsantrasyonunu azaltarak sıçanlarda trombosit hipofonksiyonuna yol açabilir.

Anahtar kelimeler: Akut stres, aPTT, D-dimer, Fibrinojen, INR, PT

To cite this article: Koç Ç., Ekici M. The Effects of Restraint and Cold Restraint Stress on Coagulation Indicators in Wistar Albino Rats. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):160-165

Submission: 20.01.2023 Accepted: 16.05.2023 Published Online: 25.05.2023

ORCID ID; ÇK: 0000-0002-2925-6849, ME: 0000-0002-2163-6214

*Corresponding author e-mail: mehmetekici@cumhuriyet.edu.tr

INTRODUCTION

Stress-related factors such as increased platelet activation, endothelial dysfunction, coagulation, up-regulated inflammatory response, and altered fibrinolysis are crucial in the thrombotic processes linked to cardiovascular events (Sandrini et al. 2020). Numerous research on human hemostasis indicates that acute psychophysiological stress simultaneously stimulates coagulation and fibrinolysis, but also raises coagulation further, resulting in hypercoagulability (von Känel et al. 2001, Wirtz et al. 2008). In stressful conditions, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and autonomic nerve system (ANS) are activated as a part of the organism's adaptive response, releasing glucocorticoids and catecholamines (norepinephrine and adrenaline), which either directly or indirectly affect hemostasis (Sandrini et al. 2020).

Acute stress has different results on platelet reactivity in healthy subjects. Platelet surface glycoproteins, fibrinogen receptors, and P-selectin increased the expression of the organism to prevent excessive bleeding during acute stress, and the interaction with leukocytes and supports them come together (Strike et al. 2004). In addition to blood hyperviscosity, reduced plasma volume increased hematocrit, and activated coagulation factors, psychologically acute stress enhances plasma filtration in healthy individuals (Austin et al. 2012, Zraggen et al. 2005). On the other hand, a recent study found that the expression of P-selectin on the platelet surface was significantly increased in mice after 9 hours of stress (Pethaperumal et al. 2022). It has certainly been demonstrated in different animal models that sustained and intense stress increases platelet production and activation, enhancing the ability of thrombin and ADP to stimulate platelet aggregation and promote platelet-leukocyte interaction (Matsuhisa et al. 2014, Sandrini et al. 2017). It has been documented that individuals exposed to acute mental stress tend to increase the level of D-dimer with an increase in the level of some coagulation factors (FVII: C, FVIII: C, FXII: C, von Willebrand factor antigen (vWF)) and fibrinogen (Zraggen et al. 2005). In another study on humans, it was reported that aPTT decreased, and fibrinogen, FVIII: C, D-dimer, and PT values increased significantly in psychologically acute stress exposure (Austin et al. 2012). These inconsistencies may result from numerous study variations, including stress levels and platelet aggregation measuring techniques.

In the literature, the effects of different stress protocols (repeated cold stress, acute vital stress, immobilization stress, water immersion stress, restraint stress, cold stress) on platelet functions have been investigated in previous rat and mouse stress studies (Bondarchuk et al. 2020, Hata et al. 1992, Hatu et al. 1991, Kawabata and Hata 1993, Loban'Chereda and Novosel'tseva 1990, Malyszko et al. 1994, Pethaperumal et al. 2022, Takeda et al. 1992).

In this study, we hypothesized that acute restraint and cold restraint stress protocols might have different effects on the coagulation profile and that mobility restriction with hypothermia might enhance the activation of the coagulation cascade. There is no experimental study on this subject in the literature. The aim of this study was to investigate the effects of restraint and cold restraint stress from acute stress protocols on coagulation indicators in rats.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out with approval from the Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Ethics Committee (Approval No: 65202830 - 050.04.04 - 640). The animals were provided by the Experimental Animals Application and Research Center of Sivas Cumhuriyet University. The animals were housed in standard care (appropriate ventilation, 12/12 h light/dark cycle, 21-23°C temperature, 35-60% humidity) and feeding (ad-libitum water and pelleted rat feed (DSA Agrifood Products Inc., Kırıkkale)) conditions. The content of pellet feed was as follows: Crude protein (24%), crude fiber (7.62%), crude oil (3%), crude ash (8.01%), phosphorus (0.75%), sodium (0.26%), and calcium (1.23%). The study was carried out on 18 male Wistar Albino rats, 8-10 weeks of age, with a body weight of 180-220 g. Rats were randomly divided into three groups (n=6/group) and underwent a one-week adaptation period to adapt to a new housing environment. Then, the rats were left quiescent for adaptation in the experimental room for 12 hours before applying the stress procedures.

Control group: Animals in this group did not be exposed to any stress. Blood samples were taken from animals simultaneously with acute stress group animals. Blood samples were taken from animals simultaneously with acute stress group animals. Blood samples were collected by cardiac puncture under ketamine (60 mg/kg, Keta-Control, Doğa İlaç, İstanbul) and xylazine (10 mg/kg, Ksilazol, Alivira, Ankara) anesthesia using 21-gauge needles, into 1.8 mL Vacutainer® tubes (Becton Dickinson, USA) with 3.2% sodium citrate (0.109 M trisodium citrate) and gently mixed six times. Blood was analyzed within 2 hours at the latest.

Restraint stress: Restraint group: In this stress protocol, rats were placed in restrictive cylinder-shaped plastics (Broome Restraint, 63.5 x 215.9mm (2.5" dia. x 8.5")) designed for the rat as previously described (Tu et al. 2019), and their movement was restricted for 2 hours at room temperature. Then, the procedure described in the control group was repeated.

Cold Restraint stress: Cold Restraint group: As previously described, rats were kept in the restrainer (Broome Restraint, 63.5 x 215.9mm (2.5" dia. x 8.5"))

at +4°C for 2 hours (Zhu et al. 2014). The procedure described in the control group was repeated. Coagulation indicators (aPTT, PT, and fibrinogen) and D-dimer were analyzed by optical coagulometric method and latex-based immunoturbidimetric method, respectively, using an analyzer (Roche Cobas t511, Switzerland) as previously described (Kitchen et al. 2018a, Kitchen et al. 2018b). Citrated blood tubes were centrifuged at 2500 g for 15 minutes. After centrifugation, samples were checked for preanalytical errors such as correct filling of the tube and the presence of hemolytic, lipemic, or icteric plasma that could affect test results. During the study, freshly collected plasma was stored in the sealed primary tube over the cell pellet. Roche aPTT Screen Reagent contains a mixture of purified phospholipids and silica particles as an activator that stimulates the formation of factor XIIIa. Calcium chloride is then added, which initiates the intrinsic coagulation cascade. Time from addition of calcium chloride to clot formation is measured. Roche PT Rec Reagent contains recombinant human thromboplastin with a heparin-neutralizing substance and calcium that, when added to citrated rat plasma, triggers activation of the extrinsic coagulation cascade. The time between addition of the reagent to plasma and formation of a fibrin clot is measured and expressed in seconds. The reagent lot-specific ISI is used to convert the patient's PT result in seconds to the international normalized ratio (INR) using the following formula $INR = (\text{patient PT} / \text{mean normal value PT})^{ISI}$. The ISI value for a given thromboplastin reagent is determined by a method comparison of the thromboplastin reagent to be standardized with an international reference thromboplastin. The fibrinogen test is a Clauss test using lyophilized bovine thrombin at a concentration

of 100 NIH units/ml with added stabilizers and buffers. The D-dimer test is a particle-enhanced immunoturbidimetric assay in which latex particles are coated with monoclonal antihuman D-dimer antibodies (mouse) at 0.12%. The start reagent is used together with a preservative/buffer solution at pH 8.2. Antigen/antibody complexes formed by the addition of samples containing D-dimer lead to an increase in the turbidity of the test reactants. The change in absorbance with time depends on the concentration of D-dimer epitopes in the sample. The aggregate is determined turbidimetrically.

Statistical Analysis

Data analysis was performed in GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, United States). The normal distribution of the data was confirmed by the Shapiro-Wilk test. The one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparisons test was used to evaluate differences in analytes. Results were expressed as mean \pm SD. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

PT and INR values were statistically significant and higher in the restraint and cold restraint groups compared to the control group ($p < 0.05$). However, aPTT was not statistically significant between the groups ($p > 0.05$). Fibrinogen concentration was statistically significant and lower in the restraint group ($p < 0.001$) and cold restraint group compared to the control group ($p < 0.01$) (Figure 1). Interestingly, it yielded results < 0.2 in all animals in the D-dimer level groups. This value is within the reference range of 0-0.5 mg/L FEU (Table 1).

Table 1. D-Dimer concentration changes in groups.

Analyte	Groups			
	Control	Restraint	Cold Restraint	Reference range
D-Dimer (mg/L FEU)	<0.2	<0.2	<0.2	0-0.5

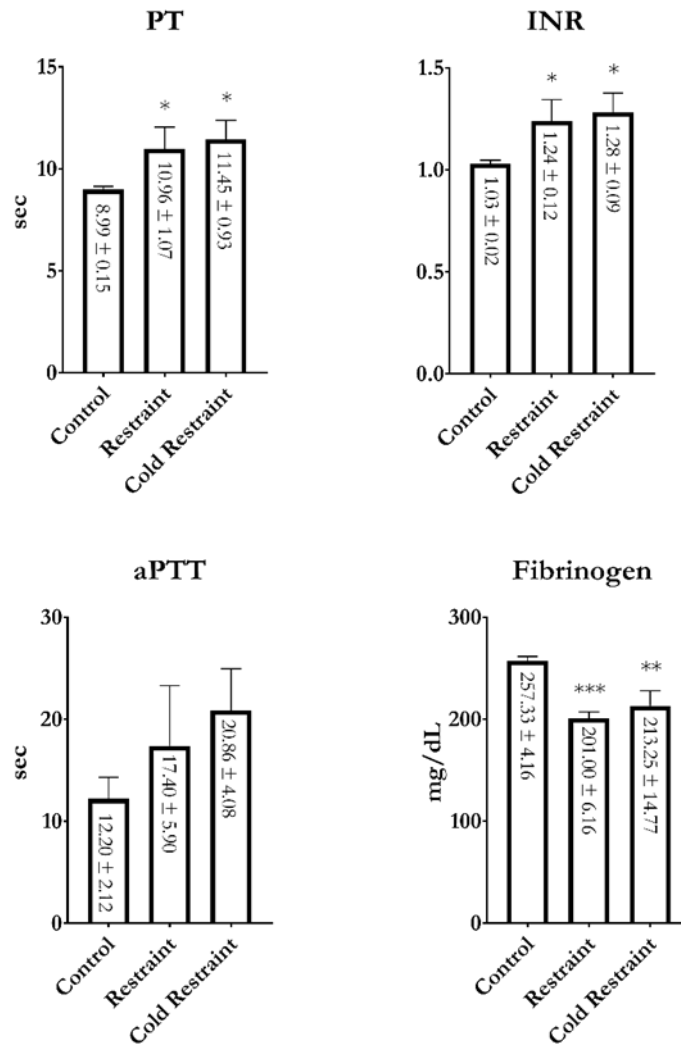


Figure 1: Coagulation parameters changes in rats exposed to restraint and cold restraint stress. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ are statistically significant compared with control group according to one way ANOVA post hoc Tukey test. PT: Prothrombin time, INR: International normalized ratio, aPTT: Activated partial thromboplastin time.

DISCUSSION

In the present study, it was observed that two different acute stress protocols (restraint and cold restraint stress) had no clear effect on aPTT from coagulation indicators in rats, increasing PT and INR values, reducing fibrinogen concentration, had no effect on D-dimer concentration. To the best of the authors' knowledge, this study was the first to compare the effect of two acute stress protocols (restraint and cold restraint) on coagulation indicators in rats. According to the "glucocorticoid cascade hypothesis of aging" which explains the relationship between aging and stress response, immobilization stress increases corticosterone production in both aged and young animals, aged rats cannot reestablish their levels for at least four hours, indicating deficiencies in the negative feedback control of the HPA axis (Sapolsky et al. 1983, Sapolsky et al. 1986).

The use of young rats in our study is important in terms of the healthy response of the negative feedback mechanism to acute stress.

The temporal measurements of the extrinsic and intrinsic routes of coagulation are, respectively, PT and aPTT. Of the studies that examined at coagulation times in individuals, two of them found that there was no change in aPTT under acute psychological stress (de Boer et al. 2007, Zraggen et al. 2005), while the other reported a shortening of aPTT (von Känel et al. 2009). One research (von Känel et al. 2004) found no change in PT, another (de Boer et al. 2007) found a tendency toward shortening, and yet another (von Känel et al. 2009) found a considerable shortening. It has been documented that individuals exposed to acute mental stress tend to increase the level of D-dimer with an increase in the

level of some coagulation factors (FVII: C, FVIII: C, FXII: C, von Willebrand factor antigen (vWF)) and fibrinogen (Zraggen et al. 2005). In another study on humans, it was reported that aPTT decreased and fibrinogen, FVIII: C, D-dimer, and PT values increased significantly in psychologically acute stress exposure (Austin et al. 2012). The most recent study (von Känel et al. 2009) included prothrombotic alterations throughout two stress sessions, whereas earlier studies only looked at reactions at one stress session, which may help to explain why these contradictory results were obtained. More strong physiological effects are more likely to result from aggregating data from numerous assessments than from just one (Kamarck et al. 2000). It is unclear how acute psychological stress induces enhanced coagulation (von Känel et al. 2009, von Känel et al. 2001). Stress-induced catecholamine spillover and altered adrenergic receptor activity are two possible mechanisms.

Although there are considerable variations in blood coagulation when compared to the human standard, rat strains are commonly used in coagulation research (Lewis et al. 1985). The most notable distinction between human and rat blood coagulation is that rats have short clotting times that are pathological in human blood (García-Manzano et al. 2001). It has been reported that activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT) lengthened, prothrombin time (PT) did not change, and fibrinogen concentration decreased in rats exposed to repeated cold stress (Hatu et al. 1991). Another study reported inhibition of platelet aggregation, extrinsic coagulation, and a reduction in fibrinogen and antithrombin III levels in young rats subjected to experimental acute vital stress (prey animal; snake). In addition, increased platelet count with decreased aggregation capacity, hypocoagulation via the intrinsic pathway of plasma hemostasis activation, signs of thrombinemia, and increased antithrombin III have been reported in aged rats (Bondarchuk et al. 2020). While some studies have shown that platelet function increases response to acute stress (von Känel and Dimsdale 2000), it has been reported that it has no significant effect on platelet aggregation in mice (Matsuhisa et al. 2014). It has been shown that acute stress (water immersion restraint and cold restraint) in rats may cause a decrease in platelet aggregation (Malyszko et al. 1994, Takeda et al. 1992). In dogs under anesthesia, acute hypothermia led to transient platelet hypoaggregability (Yoshihara et al. 1985). In our study, although acute stress did not affect aPTT and D-dimer levels, it increased PT and INR values. In addition, fibrinogen concentration decreased under restraint and cold restraint stress. The possible reason for this is that platelet function may be impaired due to acute stress application, as previously stated in the rat study (Takeda et al. 1992). Platelet hypofunctions have been reported in the specific change in the rhythm of stressed (Hata et al. 1992, Kawabata and

Hata 1993) or immobilized (Loban²-Chereda and Novosel'tseva 1990) rats, and this is supported by our research. Another reason may be heparin which is secreted from the mast cells of rats under restraint stress (Umarova et al. 1997). Heparin increases blood anticoagulant potential in response to stress.

CONCLUSION

In conclusion, acute stress (restraint and cold restraint stress) in rats prolongs PT, increases INR, decreases fibrinogen concentration, and does not affect aPTT and D-dimer levels. Further studies on this topic are needed.

Financial Support: This study is the research result consisting of a part of the project accepted and supported within the scope of 2209-A University Students Research Projects Support Program.

Conflict of Interest: All authors have read and approved the study. There is no conflict of interest between the authors.

Authorship Contributions: The authors contributed equally to this study.

Ethics Committee Information: The study was carried out with approval from the Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Ethics Committee (Approval No: 65202830 - 050.04.04 - 640).

Acknowledgements: We appreciate Dr. Serkan Bolat's cooperation with the analysis of coagulation markers.

REFERENCES

- Austin AW, Wirtz PH, Patterson SM, Stutz M, von Känel R. Stress-induced alterations in coagulation: Assessment of a new hemoconcentration correction technique. *Psychosom Med.* 2012;74(3).
- de Boer D, Ring C, Wood M, Ford C, Jessney N, McIntyre D, Carroll D. Time course and mechanisms of mental stress-induced changes and their recovery: Hematocrit, colloid osmotic pressure, whole blood viscosity, coagulation times, and hemodynamic activity. *Psychophysiology.* 2007;44(4).
- Bondarchuk YA, Alekseeva O v., Shakhmatov II, Krinitsina IN. Response of the Hemostatic System to Acute Vital Stress in Rats. *Bull Exp Biol Med.* 2020;168(6).
- García-Manzano A, González-Llaven J, Lemini C, Rubio-Póo C. Standardization of rat blood clotting tests with reagents used for humans. *Proc West Pharmacol Soc.* 2001.
- Hata T, Kawabata A, Itoh E. Platelet hypoaggregability in rats exposed to SART stress (repeated cold stress). *Thromb Res.* 1992;65(4-5).

- Hatu T, Kawabata A, Itoh E.** Blood Coagulation and Fibrinolysis in SART-Stressed (Repeated Cold-Stressed) Rats and Drug Effects on the Altered Hemostatic Parameters. *The Japanese Journal of Pharmacology*. 1991;56(4).
- Kamarck TW, Debski TT, Manuck SB.** Enhancing the laboratory-to-life generalizability of cardiovascular reactivity using multiple occasions of measurement. *Psychophysiology*. 2000;37(4).
- von Känel R, Dimsdale JE.** Effects of sympathetic activation by adrenergic infusions on hemostasis in vivo. *Eur J Haematol*. 2000.
- von Känel R, Kudielka BM, Haeberli A, Stutz M, Fischer JE, Patterson SM.** Prothrombotic changes with acute psychological stress: Combined effect of hemoconcentration and genuine coagulation activation. *Thromb Res*. 2009;123(4).
- von Känel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE.** Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: A biobehavioral pathway to coronary artery disease? *Psychosom Med*. 2001;63(4).
- von Känel R, Preckel D, Zraggen L, Mischler K, Kudielka BM, Haeberli A, Fischer JE.** The effect of natural habituation on coagulation responses to acute mental stress and recovery in men. *Thromb Haemost*. 2004;92(6).
- Kawabata A, Hata T.** Characterization of platelet hypofunctions in rats under SART stress (repeated cold stress). *Thromb Res*. 1993;69(2).
- Kitchen S, Geisen U, Kappelmayer J, Quehenberger P, Lowe A, Jones R, Miles G, Boehm JG, Rozsnyai G.** Evaluating the analytical performance of four new coagulation assays for the measurement of fibrinogen, D-dimer and thrombin time. *Int J Lab Hematol*. 2018a;40(6).
- Kitchen S, Geisen U, Kappelmayer J, Quehenberger P, Drieß J, Lowe A, Jones R, Boehm JG, Miles G, Rozsnyai G.** Evaluating the analytical performance of five new coagulation assays for the measurement of prothrombin time and activated thromboplastin time. *Int J Lab Hematol*. 2018b Dec;40(6).
- Lewis JH, van Thiel DH, Hasiba U, Spero JA, Gavaler J.** Comparative hematology and coagulation: Studies on rodentia (Rats). *Comp Biochem Physiol A Physiol*. 1985;82(1).
- Loban'-Chereda GA, Novosel'tseva T v.** [Coagulative capacity of the blood and anti-aggregative activity of the vascular wall in rats subjected to immobilization stress]. *Fiziol Zh* [Internet]. 1990;36(2): 13—18. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/2113873>
- Malyszko J, Urano T, Takada Y, Takada A.** Time-dependent changes in platelet aggregation, fibrinolytic activity, and peripheral serotonergic measures in rats subjected to water immersion restraint stress. *Haemostasis*. 1994;24(4).
- Matsuhisa F, Kitamura N, Satoh E.** Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. *Stress*. 2014;17(2).
- Pethaperumal S, Hung SC, Lien TS, Sun DS, Chang HH.** P-Selectin is a Critical Factor for Platelet-Mediated Protection on Restraint Stress-Induced Gastrointestinal Injury in Mice. *Int J Mol Sci*. MDPI; 2022;23(19).
- Sandrini L, Ieraci A, Amadio P, Popoli M, Tremoli E, Barbieri SS.** Apocynin Prevents Abnormal Megakaryopoiesis and Platelet Activation Induced by Chronic Stress. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017.
- Sandrini L, Ieraci A, Amadio P, Zarà M, Barbieri SS.** Impact of acute and chronic stress on thrombosis in healthy individuals and cardiovascular disease patients. *Int J Mol Sci*. 2020.
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS.** The adrenocortical stress-response in the aged male rat: impairment of recovery from stress. *Exp Gerontol*. 1983;18(1).
- Sapolsky RM, Krey LC, McEwen BS.** The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr Rev*. 1986; 7(3).
- Strike PC, Magid K, Brydon L, Edwards S, McEwan JR, Steptoe A.** Exaggerated platelet and hemodynamic reactivity to mental stress in men with coronary artery disease. *Psychosom Med*. 2004;66(4).
- Takeda H, Asaka M, Matsuno K, Ohtaki T, Miyazaki T.** Stress-induced gastric mucosal lesion and platelet aggregation in rats. *J Clin Gastroenterol*. 1992;14.
- Tu BX, Wang LF, Zhong XL, Hu ZL, Cao WY, Cui YH, Li SJ, Zou GJ, Liu Y, Zhou SF, Zhang WJ, Su JZ, Yan XX, Li F, Li CQ.** Acute restraint stress alters food-foraging behavior in rats: Taking the easier Way while suffered. *Brain Res Bull*. 2019;149.
- Umarova BA, Shapiro FB, Kogan AE, Strukova SM.** Mast cells secrete heparin during immobilization stress in rats. *Thromb Res*. 1997;85(3).
- Wirtz PH, Redwine LS, Baertschi C, Spillmann M, Ehlert U, von Känel AR.** Coagulation activity before and after acute psychosocial stress increases with age. *Psychosom Med*. 2008;70(4).
- Yoshihara H, Yamamoto T, Mihara H.** Changes in coagulation and fibrinolysis occurring in dogs during hypothermia. *Thromb Res*. 1985;37(4).
- Zraggen L, Fischer JE, Mischler K, Preckel D, Kudielka BM, von Känel R.** Relationship between hemoconcentration and blood coagulation responses to acute mental stress. *Thromb Res*. 2005;115(3).
- Zhu D, Tong Q, Liu W, Tian M, Xie W, Ji L, Shi J.** Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats. *Biochem Pharmacol*. 2014;87(3).

Cryopreservation of Ram Semen Using Capsaicin Supplemented Tris Extender

Muhammed Enes İNANÇ¹, Fatih AVDATEK², Şükrü GÜNGÖR¹, Mehmet Fuat GÜLHAN³, Kemal Tuna OLĞAÇ⁴, Barış DENK⁵, Deniz YENİ², Umut TAŞDEMİR^{6*}

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Mehmet Akif Ersoy University, Burdur, Türkiye

²Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Türkiye

³Department of Medicinal and Aromatic Plants, Vocational School of Technical Sciences, Aksaray University, Aksaray, Türkiye

⁴Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, Türkiye

⁵Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Türkiye

^{6*}Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Aksaray University, Aksaray, Türkiye

ABSTRACT

In this study, it was designed to reveal the effects of capsaicin on oxidative stress and freezability of ram semen. Ejaculates were taken from Sönmez rams and divided into five specimens and diluted with extender at different rates (4 mM, 2 mM, 1 mM, 500 µM) with and without capsaicin (control; C). Semen samples were thawed with a 37°C water bath for 30 seconds for post-thawed analysis. At the end of the study, sperm motility and kinetic parameters, plasma membrane acrosome integrity (PMAI), mitochondrial membrane potential (MMP), DNA damage, oxidant and antioxidant parameters were analyzed. A decrease was observed in the groups containing capsaicin compared to the C in terms of progressive, total motility and kinetic parameters ($p<0.05$). Besides, positive results were not obtained DNA integrity, PMAI and MMP ($p<0.05$). In conclusion; it was determined that capsaicin added to Tris extender did not have a positive effect on oxidative stress and freezing of ram semen.

Keywords: Antioxidant, Capsaicin, Ram, Spermatozoa

Kapsaisin Katkılı Tris Sulandırıcı Kullanılarak Koç Spermasının Dondurularak Saklanması

ÖZ

Bu çalışmada, kapsaisinin oksidatif stres ve koç spermasının dondurulabilirliği üzerine etkilerinin ortaya konması tasarlandı. Ejakülatlar Sönmez ırkı koçlardan alınarak beş eşit kısma ayrıldı ve farklı oranlarda (4 mM, 2 mM, 1 mM, 500 µM) kapsaisin içeren ve içermeyen (kontrol) sulandırıcı ile sulandırıldı. Sperma örnekleri çözüm sonu spermatolojik analizler için 37°C sıcaklıkta 30 saniye süre ile çözdürüldü. Çalışma sonunda spermatozoa hareketliliği ve kinetik parametreleri, plazma membran akrozom bütünlüğü (PMAI), mitokondrial membran potansiyeli (MMP), DNA hasarı, oksidan ve antioksidan parametreler analiz edildi. Progresif, total motilite ve kinetik parametreler bakımından kontrol grubuna göre kapsaisin içeren guruplarda azalma görüldü ($p<0.05$). Ayrıca DNA bütünlüğü, PMAI ve MMP'de olumlu sonuçlar elde edilmedi ($p<0.05$). Sonuç olarak; Tris sulandırıcısına ilave edilen kapsaisinin, oksidatif stres ve koç spermasının dondurulması üzerine olumlu bir etki göstermediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Kapsaisin, Koç, Spermatozoa

To cite this article: İnanç M.E., Avdatek F., Güngör Ş., Gülhan M.F., Olğaç K.T., Denk B., Yeni D., Taşdemir U. Cryopreservation of Ram Semen Using Capsaicin Supplemented Tris Extender. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):166-173

Submission: 28.02.2023 Accepted: 16.05.2023 Published Online: 27.05.2023

ORCID ID; MEI: 0000-0001-6954-6309, FA: 0000-0003-2345-8826, ŞG: 0000-0003-3460-522X, MFG: 0000-0003-4838-1597, KTO: 0000-0001-9216-7059, BD: 0000-0002-7586-0895, DY: 0000-0002-9105-5677, UT: 0000-0003-2827-1286

*Corresponding author e-mail: tasdemiru@gmail.com; umuttasdemir@aksaray.edu.tr

INTRODUCTION

Cryopreservation of semen is a method used for the preservation of spermatozoa. This method allows to increase their genetic values and strengthen selected reproductive traits (Salmani et al. 2013). Various methods have been studied for years for the cryopreservation of mammalian spermatozoa. These methods include different freezing methods and using various rates cryoprotectants (Üstüner et al. 2015). Cryopreservation of semen causes vital biological and functional changes in spermatozoa, especially affecting membranes that impair their functional abilities (Chelucci et al. 2015).

Physiological levels of reactive oxygen species (ROS) are considered a signaling force in some cellular physiological processes such as spermatogenesis, capacitation, and acrosome reaction (Sanocka and Kurpisz 2004). Excessive production of ROS such as hydrogen peroxide (H₂O₂), superoxide anion (O₂⁻), hydroxyl radical (OH) and lipid hydroperoxide (LOOH) are stated to be among the important factors in the pathophysiology of male infertility. Overproduction of these molecules can react with major macromolecules such as proteins, lipids and DNA, creating a pathological condition in cells (Aitken 2017). Spermatozoa protect themselves against oxidative stress thanks to the antioxidants in the seminal plasma (Kim and Parthasarathy 1998). There is a balance between the formation of free radicals and the rate at which they are neutralized by antioxidants, so that the cell is protected from the negative effects of free radicals. If this balance is changed in favor of free radicals, the amount of free radicals increases in the environment. Spermatozoa generally use antioxidant enzyme systems to relieve subtle oxidative stress on their own. However, in cases where the intracellular defense systems are insufficient, cellular macromolecules such as DNA, protein, carbohydrates, and lipids that are sensitive to oxidant damage are damaged (Sabuncuoğlu and Özgüneş 2011). In addition, the freezing process negatively affects spermatological parameters and fertility (Kulaksız and Daşkın 2009). Due to all these factors, researchers focused on adding substances with high antioxidant properties to extenders during semen freezing (Yeni et al. 2022).

Capsaicin (8-methyl-N-vanilyl-6-nonenamide) is an active ingredient responsible for the pungency of hot peppers. It is a potent agonist of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptors found on nociceptive sensory neurons (Szallasi and Blumberg 1999). It has been reported that capsaicin protects endothelial cells and macrophages against damage caused by low-density lipoprotein Chen et al. (2015), and hepatotoxicity in rats by acting as a direct antioxidant (Manjunatha and Srinivasan 2006). In animal models and clinical studies, capsaicin has been reported to have hypolipidemic effects Joo et al. (2010), as well as antitumor activities that suppress the transcriptional activity of beta-catenin in human colorectal cancer cells Lee et al. (2012) and induce cell death in human breast cancer via mitochondrial pathway and caspase-7

activation (Chang et al. 2011). Besides, it was determined that capsaicin effectively inhibited cell apoptosis in testes in rats with experimental testicular torsion (Sarioğlu-Buke et al. 2001).

According to the reviewed literature, no study has been found on the freezing of ram semen with capsaicin so far. In this study, it was designed to reveal the effects of capsaicin, which has been determined to have various beneficial effects for animal and human health, on oxidative stress and the freezability of ram semen.

MATERIAL and METHOD

Study Design

This study was approved by the Afyon Kocatepe University Local Ethics Committee on Animal Research, (Approval number and date; 9,533,702/333-December 17, 2020). For the study, four Sönmez rams aged between 2 to 3 were used. The ejaculates in each semen collection from rams are mixed and this process is repeated 9 times. Mixed ejaculates were divided into five aliquots and extended with Tris Based Extender with 15% egg yolk, and 6% glycerol containing four different experimental groups of capsaicin (4 mM, 2 mM, 1 mM, 500 µM) [lot number; MKCC0600-274666, ≥98%] and control. The highest working solution of capsaicin (4 mM) was dissolved in 1 ml of ethanol (Merck, 99%) and other groups were prepared.

Extended samples were frozen by liquid nitrogen vapor, and stored in a liquid nitrogen container after equilibrated in 4°C for 2 hours. Semen samples were thawed with a 37°C water bath for 30 seconds for post-thawed analysis. Motility, progressive motility, and sperm kinetic parameters were evaluated with computer assisted sperm analyzer (CASA; Sperm Class Analyzer software, SCA® v.4.2; Microptic S.L., Spain) system; Plasma membrane Acrosome Integrity (PMAI) and mitochondrial membrane potential (MMP) were evaluated by flow cytometry (Beckman Coulter, CA, USA) and DNA fragmentation was evaluated by alkaline single-cell gel electrophoresis method (COMET).

Total and Progressive Motility, Kinetic Characteristics

Analysis was conducted by CASA system and a connected phase-contrast microscope (Nikon Eclipse 50i; Japan) with a heating plate, under a negative phase-contrast (Green-filtered, Ph-) with x100 magnification. Velocities of the motile spermatozoa were detected depending on the VCL, as static (<10 µm.s⁻¹), slow (10–45 µm.s⁻¹), medium (45–75 µm.s⁻¹), rapid (>75 µm.s⁻¹), and progressive movements were determined according to spermatozoa which had ≥75% straightness. After thawing, 5 µl of samples were placed on a slide and covered with a cover slide and placed on the heating plate of the microscope at 37°C. For each of the samples, at least 200 spermatozoa were evaluated in six microscopic areas (Olgaç and Akçay 2021). Frozen-thawed semen samples were analyzed in terms of total motility (TMOT, %), progressive motility (PMOT, %),

average path velocity (VAP, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), linearity (LIN, %), straightness (STR, %), wobble (WOB, %), the amplitude of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), beat-cross frequency (BCF, Hz).

Evaluations of Flow Cytometric Analysis

The evaluations were conducted with a CytoFLEX (Beckman Coulter, CA, USA) containing 610 ± 20 , 585 ± 42 , 525 ± 40 nm emission filters and a 50 mW laser output (488 nm laser beam). An average of 10,000 events were evaluated per each analysis. Spermatozoa was selected by determining side scatter area (SSC-A) vs. forward scatter area (FSC-A) with Pseudocolor plot display. Forward Scatter Height (FSC-H) and Forward Scatter Area (FSC-A) were determined to exclude doublets (Bucker et al. 2019).

Stock solutions of stains were prepared with DMSO. 50 μL of aliquots of JC-1 (0.153 mM T3198, molecular probes, Invitrogen) FITC-PNA (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Sigma, L7381), PI [2.99 mM] L7011, (molecular probes, Invitrogen) were stored at -20°C until use.

Plasma Membrane Acrosome Integrity (PMAI)

FITC/PNA-PI staining protocol was used to detect spermatozoon AI (Inanc et al. 2019). The thawed semen samples were diluted in 492 μL of PBS to obtain a spermatozoa concentration of 5×10^6 . Then, 5 μL of FITC and 3 μL of PI were added to the mixture and incubated at 37°C for 15 min in a dark environment. Apart from non-cellular events (debris), FITC/PNA-PI-the area was named PMAI.

Mitochondrial Membrane Potential (MMP)

The MMP of the sperm was determined using the 5,5',6,6'tetrachloro-1,1',3,3'-tetramethyl benzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) (Inanc et al. 2019). The thawed sperm sample was diluted to a concentration of 5×10^6 sperm in 495 μL of PBS. Briefly, 5 μL of JC-1 was added to the mixture and incubated at 37°C for 15 min in a dark environment apart from non-cellular events (debris), spermatozoa were evaluated in terms of high mitochondrial membrane potential (HMMP) status.

Evaluations of DNA fragmentations

To perform Sperm DNA damage analysis, an alkaline single-cell gel electrophoresis method (COMET) was conducted (Gundogan et al. 2010). Stained and committed samples were evaluated via microscope (Olympus CX31) with fluorescence attachment. Spermatozoa were scored using the CometScore software (TriTek, V. 1.5). At least 200 spermatozoa were inspected and analyzed in six different microscopic fields.

Biochemistry

To evaluate lipid peroxidation, we measured the levels of malondialdehyde (MDA) using a method previously reported by (Draper and Hadley 1990). The method involved the reaction of lipid peroxides with thiobarbituric acid and measurement of the absorbance at 532 nm. The calculated amount of MDA was expressed in $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$. To

measure the activity of glutathione peroxidase (GSH), we used Ellman's method and calculated the amount as $\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$ based on the work of (Hissin and Hilf 1976). To assess total antioxidant status (TAS), we used a colorimetric test kit from Relassay Diagnostics, Gaziantep, TR. The kit measured the reduction of the oxidized radical 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) by antioxidant compounds in the samples. The resulting color change was measured at 660 nm in a spectrophotometer, and the TAS was expressed in $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. For the measurement of total oxidant status (TOS), we used the same colorimetric test kit from Relassay Diagnostics, Gaziantep, TR. The kit measured the oxidation of reduced Fe^{+2} in the kit to Fe^{+3} by oxidizing compounds, and the results were calculated as $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ based on spectrophotometric measurements at 660 nm. Finally, we calculated the oxidative stress index (OSI) using the formula $\text{OSI} = [(\text{TOS}) / (\text{TAS} \times 100)]$, as described by (Esen et al. 2012).

Statistical Analyses

Prior to conducting significance tests, the normality of the obtained data was assessed using the Shapiro-Wilks test to ensure that parametric test assumptions were met. Levene's test was employed to examine the homogeneity of variances between groups. ANOVA was utilized to control for statistical differences between variables. The Tukey test was then conducted to evaluate differences between the groups. Descriptive statistics, expressed as "mean \pm Standard Error Mean" (Mean \pm SEM), were calculated for each variable and presented. All statistical analyses were performed with a maximum error rate of 5% using the SPSS 13.0 software package. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULT

Total Motility and CASA Parameters

The results of CASA motility and kinetic parameters obtained after freezing-thawing were shown in Table 1, although there were statistical differences among the groups, no positive results were obtained in the application groups in terms of progressive and total motility. It was observed that the kinetic parameters VAP, VSL, VCL, BCF, STR, and hyperactivity values were lower in the treatment groups compared to the C ($p<0.05$).

Flow Cytometer Parameters

As shown in Table 2, although results were different among groups, capsaicin treatment caused adverse effects in PMAI and HMMP ($p<0.05$).

DNA Damage

As shown in Table 3, it was determined that the addition of capsaicin to the Tris extender did not have a positive effect on DNA damage prevention ($p<0.05$).

Oxidative Stress Parameters

As seen in Table 4, oxidative stress parameters MDA and GSH were not different among the groups ($p>0.05$). Although TAS, TOS, and OSI were different among the groups, the best results were found in the C as in other parameters ($p<0.05$).

Table 1. The mean (\pm SEM) of motility values in different doses of capsaicin (500 μ M, 1mM, 2mM and 4mM) and control group.

	Control	500 μ M	1 mM	2 mM	4 mM	P
Analysis						
Nonprogressive motility (%)	25.26 \pm 2.63 ^a	28.90 \pm 1.48 ^a	30.33 \pm 2.24 ^a	24.94 \pm 2.40 ^a	9.82 \pm 0.89 ^b	*
Progressive motility (%)	30.77 \pm 1.71 ^a	20.16 \pm 1.41 ^b	14.79 \pm 2.26 ^c	6.64 \pm 1.48 ^d	1.72 \pm 0.20 ^e	*
Total motility (%)	56.04 \pm 2.42 ^a	49.07 \pm 1.49 ^{ab}	45.13 \pm 3.90 ^b	31.59 \pm 3.10 ^c	11.54 \pm 1.05 ^d	*
VAP (μ m/s)	55.24 \pm 2.60 ^a	43.95 \pm 1.40 ^b	39.52 \pm 1.25 ^{bc}	36.89 \pm 1.17 ^c	25.13 \pm 0.78 ^d	*
VSL (μ m/s)	84.38 \pm 3.10 ^a	72.75 \pm 1.65 ^b	67.25 \pm 1.84 ^b	59.98 \pm 1.58 ^c	43.65 \pm 1.19 ^d	*
VCL (μ m/s)	24.45 \pm 0.86 ^a	20.04 \pm 0.92 ^b	16.80 \pm 1.41 ^c	10.71 \pm 0.88 ^d	1.38 \pm 0.18 ^e	*
ALH (μ m/s)	8.38 \pm 0.44 ^a	7.94 \pm 0.22 ^a	7.68 \pm 0.29 ^a	8.42 \pm 0.32 ^a	6.39 \pm 0.21 ^b	*
BCF (Hz)	62.72 \pm 0.71 ^a	59.11 \pm 1.07 ^{bc}	57.48 \pm 0.66 ^c	60.39 \pm 0.61 ^{ab}	56.62 \pm 1.02 ^c	*
LIN (%)	64.93 \pm 1.01 ^{ab}	63.06 \pm 1.21 ^{abc}	61.62 \pm 1.28 ^{bc}	65.96 \pm 1.15 ^a	60.19 \pm 1.92 ^c	*
STR (%)	39.55 \pm 2.21 ^a	30.62 \pm 1.34 ^b	26.93 \pm 1.11 ^b	27.09 \pm 1.23 ^b	17.59 \pm 0.70 ^c	*
WOB μ m s ⁻¹	43.36 \pm 1.16 ^a	39.92 \pm 1.49 ^{ab}	37.85 \pm 1.15 ^b	42.75 \pm 1.05 ^a	38.06 \pm 1.54 ^b	*
Hyperactivity μ m s ⁻¹	3.16 \pm 0.03 ^a	2.98 \pm 0.05 ^b	2.84 \pm 0.05 ^b	2.44 \pm 0.02 ^c	2.03 \pm 0.06 ^d	*

^{a, b, c, d, e} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (*p<0.05)

Table 2. The mean (\pm SEM) of Plasma membrane Acrosome Integrity (PMAI) and high mitochondrial membrane potential (HMMP) rates in different doses of capsaicin (500 μ M, 1mM, 2mM and 4mM) and control group.

	Control	500 μ M	1 mM	2 mM	4 mM	P
Analysis						
PMAI	21.70 \pm 1.46 ^a	18.41 \pm 0.08 ^b	16.99 \pm 0.58 ^b	13.23 \pm 0.56 ^c	11.74 \pm 1.54 ^c	*
HMMP	15.63 \pm 3.10 ^a	10.26 \pm 0.15 ^{bc}	10.56 \pm 0.30 ^b	12.65 \pm 0.22 ^{ab}	5.83 \pm 0.56 ^c	*

^{a, b, c} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (*p<0.05)

Table 3. The mean (\pm SEM) DNA damage values in different doses of capsaicin (500 μ M, 1mM, 2mM and 4mM) and control group.

	Control	500 μ M	1 mM	2 mM	4 mM	P
Analysis						
Tail lenght (μ m/s)	27.50 \pm 0.55 ^c	26.83 \pm 0.75 ^c	32.59 \pm 0.79 ^b	26.49 \pm 1.40 ^c	39.07 \pm 0.82 ^a	*
Tail DNA (%)	61.44 \pm 0.67 ^{ab}	57.50 \pm 1.31 ^b	61.64 \pm 2.54 ^{ab}	52.89 \pm 1.10 ^c	65.70 \pm 0.58 ^a	*
Tail moment (μ m/s)	17.99 \pm 0.67 ^d	20.19 \pm 0.77 ^c	23.84 \pm 0.54 ^b	21.85 \pm 0.53 ^c	26.61 \pm 0.80 ^a	*

^{a, b, c} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (*p<0.05)

Table 4. The mean (\pm SEM) malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH), total antioxidant status (TAS), total oxidant status (TOS) and oxidative stress index (OSI) in different doses of capsaicin (500 μ M, 1mM, 2mM and 4mM) and control group.

	Control	500 μ M	1 mM	2 mM	4 mM	P
Analysis						
MDA (μ mol/mL)	5.69 \pm 0.06	5.82 \pm 0.08	5.80 \pm 0.10	5.70 \pm 0.05	5.68 \pm 0.15	-
GSH (mg/dl)	46.58 \pm 2.89	44.27 \pm 1.21	43.84 \pm 2.30	42.56 \pm 0.72	43.33 \pm 1.79	-
TAS (mmol/trolox/ml-10 ⁹ cell/ml)	4.04 \pm 0.17 ^a	3.67 \pm 0.09 ^{ab}	3.92 \pm 0.27 ^a	3.41 \pm 0.12 ^{bc}	3.02 \pm 0.07 ^c	*
TOS (μ mol H2O2 Eqv/L)	5.30 \pm 0.46 ^b	6.02 \pm 0.24 ^{ab}	5.94 \pm 0.11 ^{ab}	6.25 \pm 0.18 ^a	6.45 \pm 0.23 ^a	*
OSI (AU)	13.15 \pm 1.14 ^c	16.46 \pm 0.77 ^b	15.43 \pm 0.96 ^{bc}	18.44 \pm 0.80 ^b	21.43 \pm 1.17 ^a	*

^{a, b, c} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (*p<0.05)

- No significant difference(p>0.05)

DISCUSSION

The addition of antioxidants to the cryopreservation medium of semen is done to protect spermatozoa against damage to motility, vitality, energy production, and DNA integrity by ROS (Armstrong et al. 1999; Krzyzosiak et al. 2000; Bilodeau et al. 2002). In recent years, different researchers have shown that TRPV1 plays a role in the maturation and function of spermatozoa. TRPV1 has been reported to be found in mature spermatozoa in many species such as duck Majhi et al. (2020), fish Majhi et al. (2013), bull Gervasi et al. (2011), wild boar Maccarrone et al. (2005) and humans (De Toni et al. 2016; Francavilla et al. 2009). It has been observed that this is a protein that induces Ca²⁺ activation flux and is involved in many biological events, including spermatozoa motility (Kumar et al. 2016). Capsaicin has proven to be a well-known specific agonist of TRPV1 and the sensitivity of TRPV1 to capsaicin is species-specific (Lee et al. 2011; Szolcsányi 2004). In this study, as in total motility, the best results in progressive motility values were obtained in group C ($p < 0.05$). In which contradictory results were presented, Hosseini et al. (2020), reported that they administered capsaicin at a dose of 2.5 mg/kg by oral gavage three times a week for two months in their study in which they created experimental varicocele, and they found that the increase in motility value was statistically significant. Chen et al. (2020), indicated positive effects on zebrafish sperm motility and fertility modulated by TRPV1. It was considered that the difference between our study and these studies may be due to the different animal species, route of administration, dose, and form. The findings in our study were in accordance with prior opinion, Park et al. (2017), stated that they conducted a preliminary study to select the most effective and safe capsaicin dose. As a result of this study, they chose 0.33 mg.kg⁻¹ capsaicin, higher doses have toxic effects on spermatogenesis and the capsaicin dose should be carefully implemented for biological therapy in mammals. Obtained results are compatible the study conducted Majhi et al. (2013), informed that administration of capsaicin did not alter motility in fish spermatozoa, and cells mostly did not respond to capsaicin.

AI is extremely important for the integrity of the spermatozoon membrane, cell integrity, and its role in successful fertilization. MMP is evaluated as a parameter related to ATP production and capacitation by spermatozoa mitochondria via oxidative phosphorylation. For this reason, MMP determination is important together with viability assessment (Korkmaz and Çil 2020). Capsaicin provoked detrimental effects in PMAI and MMP ($p < 0.05$). In a study in which contradictory results were presented, Claudia et al. (2014), revealed that exposure of spermatozoa cells to capsaicin (at 100 nM and 500 nM doses) during the capacitation period did not have a direct effect on the acrosome reaction.

However, it has been suggested that capsaicin activates receptor-specific TRPV1, causing sperm membrane depolarization due to Na⁺ influx and the consequent opening of voltage-gated calcium channels, consequently, TRPV1 channels modulate the major pathways involved in capacitation (Claudia et al. 2014). In another study, Salahshouri et al. (2022), claimed that capsaicin has positive effects on fertility and has therapeutic potential by increasing the decreased TRPV1, II, and III. level varicocele diagnosed men.

As with other parameters examined, capsaicin did not show a positive effect on DNA integrity ($p < 0.05$). In a study in which compatible results were here Hosseini et al. (2020), speculated that there was no difference in terms of DNA damage in the group given capsaicin in rats with experimental varicocele. Unlike the current study, in the freezing of ram semen by our study group using various antioxidants, it was shown that hesperidin and thymoquinone can protect spermatozoa from DNA damage, especially in freezing processes (Yeni et al. 2022; İnanç et al. 2022). Previous studies with positive results on DNA damage have shown that antioxidants play an important role in gene expression regulated by the sperm epigenome through regulation of DNA methylation (Choucair et al. 2018). Unlike the results of these studies, it was interpreted that capsaicin did not have a positive effect on DNA damage, due to its failure to show its antioxidant properties at the low temperature that occurs during the sperm freezing process.

In our study, although there was no statistical change among the groups in the secondary redox parameters MDA and GSH values ($p > 0.05$). However, it was observed that the total redox parameters TAS and TOS showed a balance in favor of oxidants in all groups compared to the C, confirming the pro-oxidant activity ($p < 0.05$). Gosh et al. (1993), reported that low doses of capsaicin treatment caused a significant increase in ultraviolet (UV) induced lipid peroxidation by showing pro-oxidant properties, while high doses caused a significant decrease in UV-induced peroxidation with its antioxidant properties. Pro-oxidant agents are compounds that can trigger a series of oxidative reactions that lead to the unfolding of proteins and DNA damage as double-strand breaks. This suggests that capsaicin may have acted as a prooxidant at the dose we used in our study.

CONCLUSION

In ram semen freezing studies, many antioxidant substances have been tested. While sometimes positive results were obtained after these treatments, sometimes appropriate results could not be obtained as presented study. For this reason, it is important to elucidate the bioactive components, detailed chemical structures, behavior patterns, animal species differences, and effective doses of the agents used in the studies. In light of the results obtained, our results suggested that

capsaicin added to the semen extender did not show any improvement or positive effect in terms of sperm motility, kinetic parameters, oxidative stress parameters and DNA damage on ram semen freezing.

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

Authors Contribution Rate: Data curation, Ş.G.; Methodology, U.T.; Investigation, D.Y., Ş.G., F.A., M.F.G., K.T.O., M.E.İ., B.D. and U.T.; Resources, U.T., D.Y., Ş.G., F.A., M.F.G. and M.E.İ.; Writing original draft, U.T. and D.Y.; Writing review and editing, U.T.; Project administration, U.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Ethics Committee Information: Afyon Kocatepe University Faculty of Veterinary Medicine Animal Care Committee with the decision numbered 49533702/333.

Financial support: This study was supported by Aksaray University Scientific Research Fund (BAP2021/008). The funders had no role in this study's design, data collection, or analyses.

Acknowledgement: The authors would like to thank Kapucuoğlu sheep farm for the use of their facilities and herd.

REFERENCES

Aitken, R. J. (2017). Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. *Molecular reproduction and development*, 84(10), 1039-1052.

Armstrong, J. S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W. J., & Sikka, S. C. (1999). Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(7-8), 869-880.

Bilodeau, J. F., Blanchette, S., Cormier, N., & Sirard, M. A. (2002). Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, 57(3), 1105-1122.

Bucher, K., Malama, E., Siuda, M., Janett, F., & Bollwein, H. (2019). Multicolor flow cytometric analysis of cryopreserved bovine sperm: a tool for the evaluation of bull fertility. *Journal of dairy science*, 102(12), 11652-11669.

Chang, H. C., Chen, S. T., Chien, S. Y., Kuo, S. J., Tsai, H. T., & Chen, D. R. (2011). Capsaicin may induce breast cancer cell death through apoptosis-inducing factor involving mitochondrial dysfunction. *Human & experimental toxicology*, 30(10), 1657-1665.

Chelucci, S., Pasciu, V., Succu, S., Addis, D., Leoni, G. G., Manca, M. E., & Berlinguer, F. (2015). Soybean lecithin-based extender preserves spermatozoa membrane integrity and fertilizing potential during goat semen cryopreservation. *Theriogenology*, 83(6), 1064-1074.

Chen, K. S., Chen, P. N., Hsieh, Y. S., Lin, C. Y., Lee, Y. H., & Chu, S. C. (2015). Capsaicin protects endothelial cells and macrophage against oxidized low-density lipoprotein-induced injury by direct antioxidant action. *Chemico-Biological Interactions*, 228, 35-45.

Chen, Y., Wang, H., Wang, F., Chen, C., Zhang, P., Song, D., & Zeng, X. (2020). Sperm motility modulated by Trpv1 regulates zebrafish fertilization. *Theriogenology*, 151, 41-51.

Choucair, F., Saliba, E., Abou Jaoude, I., & Hazzouri, M. (2018). Antioxidants modulation of sperm genome and epigenome damage: Fact or fad? Converging evidence from animal and human studies. *Middle East Fertility Society Journal*, 23(2), 85-90.

Claudia, C., Horatiu, S., Iudith, I., & Constanta, B.V.S. (2014). Research regarding the role of TRPV1 and capsaicin (CPS) implication for capacitation and acrosome reaction. *Romanian Biotechnological Letters*, 19(3), 9437.

De Toni, L., Garolla, A., Menegazzo, M., Magagna, S., Di Nisio, A., Šabović, I., & Foresta, C. (2016). Heat sensing receptor TRPV1 is a mediator of thermotaxis in human spermatozoa. *PLoS one*, 11(12), e0167622.

De, A. K., Ghosh, J. J., & Mandal, T. K. (1993). Ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation in liposomal membrane: Modification by capsaicin. *Phytotherapy Research*, 7(1), 87-89.

Draper, H. H., & Hadley, M. (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In *Methods in enzymology*. Academic press, 186, 421-431.

Esen, Ç., Alkan, B. A., Kırnay, M., Akgül, Ö., Işıkoğlu, S., & Ereli, Ö. (2012). The effects of chronic periodontitis and rheumatoid arthritis on serum and gingival crevicular fluid total antioxidant/oxidant status and oxidative stress index. *Journal of periodontology*, 83(6), 773-779.

Francavilla, F., Battista, N., Barbonetti, A., Vassallo, M. R. C., Rapino, C., Antonangelo, C., & Maccarrone, M. (2009). Characterization of the endocannabinoid system in human spermatozoa and involvement of transient receptor potential vanilloid 1 receptor in their fertilizing ability. *Endocrinology*, 150(10), 4692-4700.

Gervasi, M. G., Osycka-Salut, C., Caballero, J., Vazquez-Levin, M., Pereyra, E., Billi, S., & Perez-Martinez, S. (2011). Anandamide capacitates bull spermatozoa through CB1 and TRPV1 activation. *PLoS One*, 6(2), e16993.

Gundogan, M., Yeni, D., Avdatek, F., & Fidan, A. F. (2010). Influence of sperm concentration on the motility, morphology, membrane and DNA integrity along with oxidative stress parameters of ram sperm during liquid storage. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 200-207.

Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, 74(1), 214-226.

Hosseini, M., Tavalae, M., Rahmani, M., Eskandari, A., Shaygannia, E., Kiani-Esfahani, A., & Nasr-Esfahani, M. H. (2020). Capsaicin improves sperm quality in rats with experimental varicocele. *Andrologia*, 52(11), e13762.

İnanç, M. E., Güngör, Ş., Öztürk, C., Korkmaz, F., Baştan, İ., & Çil, B. (2019). Cholesterol-loaded cyclodextrin plus trehalose improves quality of frozen-thawed ram sperm. *Veterinari Medicina*, 64,(03), 118-124.

- İnanç, M. E., Güngör, S., Avdatek, F., Yeni, D., Gülhan, M. F., Olgaç, K. T., Denk, B., & Taşdemir, U. (2022).** Thymoquinone improves motility, plasma membrane integrity and DNA integrity of frozen-thawed ram semen. *Andrologia*, 54(10), e14547.
- Joo, J. I., Kim, D. H., Choi, J. W., & Yun, J. W. (2010).** Proteomic analysis for antiobesity potential of capsaicin on white adipose tissue in rats fed with a high fat diet. *Journal of proteome research*, 9(6), 2977-2987.
- Kim, J. G., & Parthasarathy, S. (1998, December).** Oxidation and the spermatozoa. In *Seminars in reproductive endocrinology*. Thieme Medical Publishers, Inc., 16,(04),235-339.
- Korkmaz, F., & Çil, B. (2020).** Akış Sitometrisinin (Flow Cytometry) Sperma Kalite Analizlerinde Kullanımı. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(1), 76-83.
- Krzyzosiak, J., Evenson, D., Pitt, C., Jost, L., Molan, P., & Vishwanath, R. (2000).** Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(6), 251-261.
- Kulaksız, R., & Daşkın A. (2009).** Farklı antioksidanlarla dondurulan Saanen teke spermasının in vitro ve in vivo değerlendirilmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 56, 201-205.
- Kumar, A., Majhi, R. K., Swain, N., Giri, S. C., Kar, S., Samanta, L., & Goswami, C. (2016).** TRPV4 is endogenously expressed in vertebrate spermatozoa and regulates intracellular calcium in human sperm. *Biochemical and biophysical research communications*, 473(4), 781-788.
- Lee, S. H., Richardson, R. L., Dashwood, R. H., & Baek, S. J. (2012).** Capsaicin represses transcriptional activity of β -catenin in human colorectal cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 23(6), 646-655.
- Lee, Y. M., Kang, S. M., Lee, S. R., Kong, K. H., Lee, J. Y., Kim, E. J., & Chung, J. H. (2011).** Inhibitory effects of TRPV1 blocker on UV-induced responses in the hairless mice. *Archives of dermatological research*, 303, 727-736.
- Maccarrone, M., Barboni, B., Paradisi, A., Bernabò, N., Gasperi, V., Pistilli, M. G., & Mattioli, M. (2005).** Characterization of the endocannabinoid system in boar spermatozoa and implications for sperm capacitation and acrosome reaction. *Journal of Cell Science*, 118(19), 4393-4404.
- Majhi, R. K., Kumar, A., Giri, S. C., & Goswami, C. (2020).** Differential expression and localization of thermosensitive Transient Receptor Potential Vanilloid (TRPV) channels in the mature sperm of white pekin duck (*Anas platyrhynchos*). *bioRxiv*, 2020-02.
- Majhi, R. K., Kumar, A., Yadav, M., Swain, N., Kumari, S., Saha, A., & Goswami, C. (2013).** Thermosensitive ion channel TRPV1 is endogenously expressed in the sperm of a fresh water teleost fish (*Labeo rohita*) and regulates sperm motility. *Channels*, 7(6), 483-492.
- Manjunatha, H., & Srinivasan, K. (2006).** Protective effect of dietary curcumin and capsaicin on induced oxidation of low-density lipoprotein, iron-induced hepatotoxicity and carrageenan-induced inflammation in experimental rats. *The FEBS journal*, 273(19), 4528-4537.
- Olgaç, K. T., & Akçay, E. (2021).** Effects of Spermine and Spermidine supplemented extenders on post-thaw Spermatological Parameters in Stallion Semen Cryopreservation. *Cryobiology*, 100, 72-76.
- Park, S. G., Yon, J. M., Lin, C., Gwon, L. W., Lee, J. G., Baek, I. J., & Nam, S. Y. (2017).** Capsaicin attenuates spermatogenic cell death induced by scrotal hyperthermia through its antioxidative and anti-apoptotic activities. *Andrologia*, 49(5), e12656.
- Sabuncuoğlu, S., & Özgüneş, H. (2011).** Kemoterapi, serbest radikaller ve oksidatif stres. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy*, (2), 137-150.
- Salahshouri, S., Akbarian, F., Tavalace, M., Seifati, S. M., & Nasr-Esfahani, M. H. (2022).** Expression of TRPV1 as A Heat Sensitive Voltage-Dependent Ion Channel and Oxidative Stress in Sperm Samples of Infertile Men with Varicocele: A Case-Control Study. *Cell Journal (Yakhteh)*, 24(6), 323.
- Salmani, H., Nabi, M. M., Vaseghi-Dodaran, H., Rahman, M. B., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shakeri, M., ... & Zhandi, M. (2013).** Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. *Small ruminant research*, 112(1-3), 123-127.
- Sanocka, D., & Kurpisz, M. (2004).** Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive biology and endocrinology*, 2(1), 1-7.
- Sarioglu-Buke, A., Erdem, S., Gedikoglu, G., Bingol-Kologlu, M., & Tanyel, F. C. (2001).** Capsaicin effectively prevents apoptosis in the contralateral testis after ipsilateral testicular torsion. *BJU international*, 88(7), 787-789.
- Szallasi, A., & Blumberg, P. M. (1999).** Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological reviews*, 51(2), 159-212.
- Szolcsányi, J. (2004).** Forty years in capsaicin research for sensory pharmacology and physiology. *Neuropeptides*, 38(6), 377-384.
- Üstüner, B., Nur, Z., Alcay, S., Toker, M. B., Sağırkaya, H., & Soyulu, M. K. (2015).** Effect of freezing rate on goat sperm morphology and DNA integrity. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 39(1), 110-114.
- Yeni, D., Güngör, Ş., Avdatek, F., Gülhan, M.F., Olgaç, K.T., İnanç, M.E., Denk, B. & Taşdemir, U. (2022).** Investigation of Changes in Spermatozoon Characteristics, Chromatin Structure, and Antioxidant/Oxidant Parameters after Freeze-Thawing of Hesperidin (Vitamin P) Doses Added to Ram Semen. *Life*, 12, 1780.

Serum C-Reactive Protein, Procalcitonin, and Ceruloplasmin Concentrations in Dogs with Naturally Infected Ehrlichiosis

Gülten Emek TUNA^{1*}, Gamze Sevri EKREN AŞICI², Pınar Alkım ULUTAŞ²

¹Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 09010, Aydın, Türkiye

²Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, 09010, Aydın, Türkiye

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the concentrations of C-reactive protein (CRP), Procalcitonin (PCT), and ceruloplasmin (Cp), which are potential biochemical markers of the inflammatory process in dogs naturally infected with Ehrlichiosis. A total of 20 dogs, 8 clinically healthy (Healthy group) and 12 mono-infected with *Ehrlichia* spp. (Ehrlichia group) were included in the study. Dogs in the Ehrlichia group were selected from those showing clinical signs of active infection, and their diseases were diagnosed with commercial test kits. Serum CRP and PCT levels were analysed by commercially available test kits, and Cp concentration was determined by colourimetric methods. The CRP concentration in the Ehrlichia group was significantly higher compared to the healthy group. There was no significant difference between the groups in serum PCT and Cp concentrations. As a result, the increase in serum CRP concentration can be used for detecting inflammatory processes in dogs with Ehrlichiosis. In addition, this study showed that PCT and Cp concentrations are not clinically useful markers for determining inflammatory status in dogs with Ehrlichiosis.

Keywords: Key Words: C-Reactive Protein, Ceruloplasmin, Dog, Ehrlichiosis, Procalcitonin

Ehrlichiosis ile Doğal Enfekte Köpeklerde Serum C-Reaktif Protein, Prokalsitonin ve Seruloplazmin konsantrasyonları

ÖZ

Bu çalışma, Ehrlichiosis ile doğal enfekte köpeklerde inflamatuvar sürecin potansiyel biyokimyasal belirteçlerinden olan C-reaktif protein (CRP), Prokalsitonin (PCT) ve seruloplazmin (Cp) konsantrasyonlarını değerlendirmeyi amaçladı. Çalışmaya, klinik olarak sağlıklı 8 (Sağlıklı grup) ve *Ehrlichia* spp. ile mono enfekte 12 (Ehrlichia grubu) olmak üzere toplam 20 köpek dahil edildi. Ehrlichia grubundaki köpekler, klinik olarak aktif enfeksiyon belirtileri gösteren köpekler arasından seçildi ve hastalıkları, ticari test kitleri ile teşhis edildi. Serum CRP ve PCT seviyeleri köpek spesifik ticari ELISA test kitleri ile analiz edildi ve Cp konsantrasyonu kolorimetrik yöntemle belirlendi. Ehrlichia grubundaki CRP konsantrasyonu, sağlıklı grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksekti. Serum PCT ve Cp konsantrasyonlarında gruplar arasında anlamlı fark yoktu. Sonuç olarak, serum CRP konsantrasyonundaki artış, Ehrlichiosis'li köpeklerde inflamatuvar süreçlerin saptanmasında kullanılabilir. Ek olarak bu çalışma, PCT ve Cp konsantrasyonlarının Ehrlichiosis'li köpeklerde inflamatuvar durumu belirlemek için klinik olarak yararlı belirteçler olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: C-reaktif protein, Ehrlichiosis, köpek, prokalsitonin, seruloplazmin

To cite this article: Tuna GE, Ekren Aşıcı GS, Ulutaş PA.. Serum C-Reactive Protein, Procalcitonin, and Ceruloplasmin Concentrations in Dogs with Naturally Infected Ehrlichiosis (2023) 16(2):174-181

Submission: 18.01.2023

Accepted: 17.05.2023

Published Online: 29.05.2023

ORCID ID; GET: 0000-0002-9729-8813, GSEA: 0000-0002-9625-7956, PAU: 0000-0002-2447-3027

*Corresponding author e-mail: emektuna@adu.edu.tr

INTRODUCTION

Vector-mediated bacteria and parasites are important pathogens of domestic dogs and potentially important to public health (Chomel 2011, Maggi ve Krämer 2019). *Ehrlichia canis* (*E. canis*), *Ehrlichia chaffeensis* (*E. chaffeensis*) and *Ehrlichia ewingii* (*E. ewingii*) are gram-negative obligate intracellular bacterias transmitted by ticks and cause Ehrlichiosis in dogs (Ansari-Mood et al. 2010, Fonseca et al. 2017). Canine Ehrlichiosis has a worldwide distribution. However, only *Ehrlichia canis* species that cause canine monocytic Ehrlichiosis (CME) have been isolated from dogs in Türkiye (Duzlu et al. 2014, Aktas and Özübek 2019, Ayan et al. 2020). The clinical manifestation of CME shows a wide distribution due to several factors, such as the agent's strain, the dog's breed, the concurrent diseases and the state of the dog's immune system (de Castro et al. 2004, Harrus and Waner 2011). The disease is clinically divided into acute, subclinical, and chronic stages (Harrus and Waner 2011, Mylonakis et al. 2019). The acute phase of the disease is characterised by fever, depression, lethargy, anorexia, lymphadenomegaly, splenomegaly, eye lesions, and hemorrhagic disorders. In the subclinical period of the disease, no clinical findings may occur. In the chronic phase of the disease, the symptoms are very similar to the findings in the acute phase, but sometimes they can be much more severe (Moonarmart et al. 2014, Bhadesiya and Raval 2015, Mylonakis et al. 2019).

Acute-phase proteins (APPs) are non-specific innate immune components potentially indicators of inflammation and tissue injury (Murata et al. 2004, Schmidt and Eckersall 2015). C-reactive protein (CRP) and ceruloplasmin (Cp) are positive APPs. In human and veterinary medicine, these non-specific markers can help diagnose, determine disease severity, and monitor response to treatment and prognosis in various diseases and conditions (Cray et al. 2009, Mylonakis et al. 2011, Schmidt and Eckersall 2015,

Pardo-Marin et al. 2020). While CRP is important in protecting against infection, clearing damaged tissue, preventing auto-immunisation and regulating the inflammatory response (Waritani et al. 2020), Cp is an α -2 glycoprotein that carries copper and is essential for wound healing and protection. It protects cells and tissues against oxidant compounds (Cerón and Martínez-Subiela 2004).

Procalcitonin is a forerunner of calcitonin, a peptide (prohormone) released from parafollicular cells of the thyroid gland. Recently, PCT has been used in human medicine to diagnose bacterial infection as an acute-phase reactant (Goggs et al. 2018, Bassetti et al. 2019, Matur et al. 2021). PCT appears to be an earlier and better marker in sepsis and severe infections than inflammatory markers, for instance, CRP and white blood cell (WBC) count. It is also widely used to evaluate the efficacy of antibiotic therapy in humans (Schuetz et al. 2016). Procalcitonin rises markedly in two to four hours in severe systemic inflammation or bacterial infections and remains elevated until this pathological situation resolves. Therefore, PCT is important in rapidly diagnosing sepsis, minimising mortality, and reducing the redundant usage of antibiotics (Meisner 2015, Battaglia et al., 2020). There are a limited number of studies in dogs on serum procalcitonin levels, which are widely used in bacterial infections and sepsis in humans. With the increase in the number of dog-verified tests in recent years, the number of studies on procalcitonin is also increasing. Studies have focused especially on dogs with sepsis; significant differences were found between healthy dogs and dogs with sepsis (Yılmaz et al. 2008, Easley et al. 2020).

The CME caused by the Gram (-) bacterium *E. canis* causes a significant inflammatory response (Harrus and Waner 2011). However, there are limited studies on inflammatory and infection biomarkers in

dogs with Ehrlichiosis (Mylonakis et al. 2011, Karnezi et al. 2016, Matur et al. 2021, Singh et al. 2021). Therefore, this study aimed to evaluate serum CRP, PCT and Cp concentrations in dogs with naturally infected Ehrlichiosis and reveal their clinical availability.

MATERIAL and METHODS

Ethical approval for the study was granted by The Animal Research Ethics Committee of the Aydın Adnan Menderes University (number 64583101/2022/007).

The study was conducted at Aydın Adnan Menderes University Faculty of Veterinary Medicine Animal Hospital. Twenty owned dogs, including 8 healthy and 12 dogs with Ehrlichiosis, were included in the study. The anamnesis, physical examination findings and laboratory results of all dogs were recorded.

The venous blood samples were taken from the cephalic vein into an anticoagulant (ethylenediaminetetraacetic acid) and clot activator tube. Complete blood counts (CBC) were performed with an automated blood analyser (Abacus Vet 5, Diatron MI LTD, Hungary) from blood samples with the anticoagulant. Serum was obtained from the samples collected in the clot activator tube. Blood samples taken into a clot activator tube were centrifuged at 3000 g for 10 minutes and separated serums. Some of the serum samples were used for vector-borne disease screening tests, and the remainder was stored at -20°C for CRP, Cp and PCT analysis.

Dogs with Ehrlichiosis were selected from dogs that showed clinical (such as fever, generalised lymphadenopathy, anorexia, splenomegaly, lethargy, petechiae, epistaxis, eye lesion) and laboratory findings (such as thrombocytopenia, anaemia) consistent with the disease. These dogs were simultaneously screened

with the SNAP 4Dx Plus (IDEXX Laboratories, Inc., USA) assay kit for *E. canis*, *E. ewingii* (for *Ehrlichia* spp. 97.1% sensitivity and 95.3% specificity), *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*), *Anaplasma phagocytophilum* (*A. phagocytophilum*), *Anaplasma platys* (*A. platys*) and *Dirofilaria immitis* (*D. immitis*). Dogs were also screened for Leishmaniasis with the commercial test kit SNAP Leishmania (IDEXX Laboratories, Inc., USA). In addition, blood smears were made from anticoagulant blood taken from dogs, and *Babesia* spp., *Hepatozoon* spp. and *Hemotropic Mycoplasmas* were examined. Only *Ehrlichia* spp. mono-infected dogs were included in the study. Dogs with concurrent disease, inflammatory conditions, and the use of any medication (such as antibiotics and anti-inflammatories) were excluded from the study.

Healthy dogs were selected from dogs brought in for annual routine control, vaccination and elective surgery (ovariohysterectomy or castration). According to clinical examination and laboratory findings (CBC and routine serum biochemistry), these dogs did not show any signs of disease. Also, blood smear, SNAP4DxPlus, and Snap Leishmania results were negative. Thus, these dogs were considered healthy and included in the study as the healthy group.

Procalcitonin (Sun Red Bio. Shanghai, China) and CRP concentrations (Solid phase sandwich ELISA kit Tridelta Development LTD, Ireland) from serum samples were determined with canine-specific solid sandwich ELISA commercial test kits. Serum Cp concentrations were measured spectrophotometrically in a spectrophotometer device (Shimadzu UV-1601, Japan) using the method reported by Sunderman and Numato (1970).

Numerical data obtained from *Ehrlichia* spp. seropositive and healthy dogs were analysed using the SPSS package program 19.0 (SPSS, Armonk, NY: IBM Corp). Although PCT and WBC showed normal distribution according to the Shapiro-Wilk normality

test results, non-parametric tests were used for all parameters considering the sample size. The median values of WBC, CRP, PCT and Cp were compared with the non-parametric Mann-Whitney U test. For all assessments, p-value less than 0.05 suggested that the difference was statistically significant.

RESULTS

Based on history, physical examination and laboratory results, eight dogs were healthy (Healthy group), and 12 were *Ehrlichia spp.* seropositive (Ehrlichia group). The mean age of the healthy group was 3.25 ± 1.04 years (between 1 and 5 years), and there were five male dogs and three female dogs. Several breeds were included in the healthy group: Golden Retriever (n = 3), Maltese Terrier (n = 2), mixed breed (n = 2), and Dobermann Pinscher (n = 1).

The mean age of the Ehrlichia group was 2.67 ± 1.17 years old. Eight of these dogs were male, and 4 of them were female. The most common breeds were Golden Retriever (n = 3) and Crossbreed (n = 3), followed by Maltese Terrier (n = 2), Anatolian shepherd dog (n = 9), Pekingese (n = 1) and Pug (n = 1). In this group, all dogs had at least two or three clinical and laboratory findings of active disease. These clinical and haematological findings are presented in Table 1.

The mean serum CRP concentration of the Ehrlichia group was significantly ($p= 0.002$) higher than the healthy group (Figure 1B). There was no statistical significance between the groups in WBC counts ($p= 0.217$), serum PCT ($p= 0.939$) and Cp ($p= 0.615$) concentrations (Figure 1A, C, D).

Table 1. Clinical and haematological findings in dogs in the Ehrlichia group.

Clinical abnormality	n (%)	Haematological abnormality	n (%)
Depression or lethargy	12 (100)	Thrombocytopenia	10 (83.33)
Anorexia	12 (100)	Anaemia	8 (66.67)
Lymphadenomegaly	10 (83.33)	Leucocytosis	3 (25)
Fever (>39.5°C)	9 (75)	Leucopenia	3 (25)
Mucosal pallor	8 (66.67)	Lymphopenia	3 (25)
Tick infestation	7 (58.33)		
Ocular lesion	6 (50)		
Bleeding tendency	1 (8.33)		

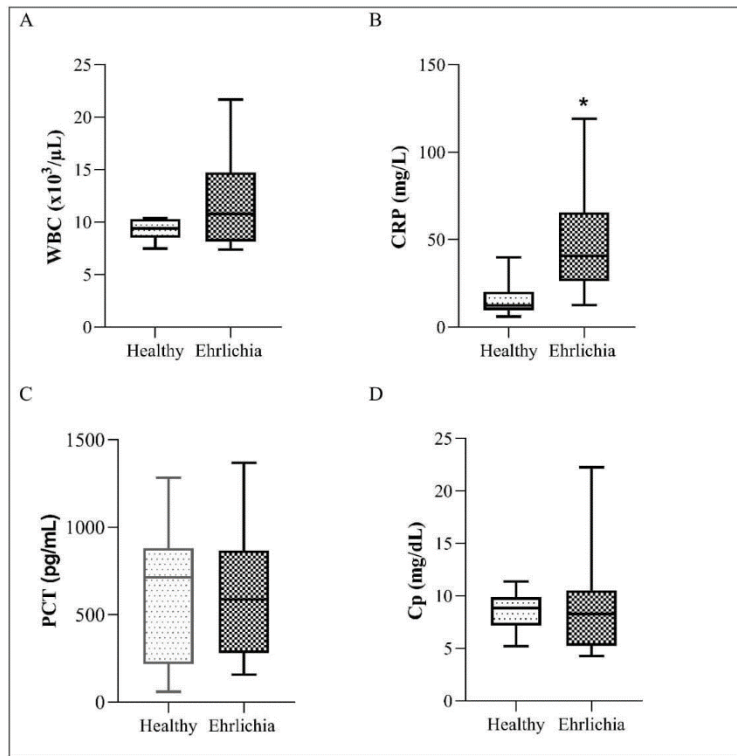


Figure 1. Box and whisker plot showing (A) WBC count, (B) CRP, (C) PCT and (D) Cp concentration in healthy and Ehrlichia groups. Abbreviation: Cp: ceruloplasmin, CRP: C-Reactive Protein, PCT: Procalcitonin, WBC: White blood cells, *: statistically significant differences at $p < 0.05$.

DISCUSSION

Canine Ehrlichiosis is a worldwide vector-borne disease caused by the gram (-) bacteria *Ehrlichia* species. It is reported that CME causes a marked inflammatory response (Harrus and Waner 2011, Karnezi et al. 2016, Singh et al. 2021). Thus, the current study aimed to evaluate the concentration and clinical usability of inflammatory markers such as CRP, PCT and Cp in dogs with Ehrlichiosis. This study found that the serum CRP concentration is statistically significantly higher in the Ehrlichia group than in the healthy group ($p = 0.002$). Nevertheless, there was no statistical difference between the groups in serum PCT and Cp concentrations ($p > 0.05$).

In dogs, CRP is considered the major acute-phase protein and serum/plasma CRP concentration is increased in various inflammatory diseases (Nakamura et al. 2008, Asawakarn et al. 2021). Some

researcher reported that CRP concentration (Rikihisa et al. 1994, Nakamura et al. 2008, Mylonakis et al. 2011, Munhoz et al. 2012, Asawapattanakul et al. 2021, Singh et al. 2021, Jaheen et al. 2022). Rikihisa et al. (1994) and Asawapattanakul et al. (2021) reported that the serum CRP concentrations in dogs with naturally infected *E. canis* were higher than in healthy dogs. Mylonakis et al. (2011) have shown that the CRP concentrations in dogs with and without myelosuppression were significantly higher than in healthy dogs. They have also correlated myelosuppression with chronic CME and reported that the increase in CRP concentration in these dogs was much higher than in dogs with acute disease. The study mentioned above has also noted that using CRP and some APPs with other tests may help assess the clinical severity of CME. Also, one experimental study showed that CRP concentration increases significantly between 4-16 days after

experimental infection and reaches peak points between 1-6 weeks (Shimada et al. 2002). Similar to the studies performed in experimental and naturally infected dogs with Ehrlichiosis, the serum CRP concentration in the Ehrlichia group was statistically significantly higher than the healthy group in our study. It is known that CME causes infiltration of mononuclear cells, macrophages and plasma cells in the subendothelial layer and perivascular region of many organs in dogs, leading to a marked inflammatory reaction (Abiramalatha et al. 2018, Singh et al. 2021). The increased serum CRP concentration in the Ehrlichia group in this study may also be associated with the abovementioned inflammatory reaction. In the studies conducted, the relationship between the severity of the disease and the CRP concentration was evaluated according to the presence of myelosuppression (Mylonakis et al. 2011). Since no dogs with myelosuppression were in the Ehrlichia group, this study could not evaluate the correlation between disease severity and CRP.

Increased PCT in bacterial infections has been reported in human and veterinary medicine (Reitman et al. 2012, Liu et al. 2015, Cho et al. 2021). This increase is more sensitive and specific than other inflammatory markers, such as an APP, in differentiating bacterial infections from non-infectious diseases (Schuetz et al. 2012, Cho et al. 2021). There are limited studies of PCT in dogs infected with the gram-negative bacteria *Ehrlichia* spp. (Matur et al. 2021, Jaheen et al. 2022). Matur et al. (2021) showed that the PCT concentration was not statistically significant between dogs with Ehrlichiosis and the control group. In contrast to this study, Jaheen et al. (2022) determined that the PCT concentration in dogs with Ehrlichiosis was significantly higher than in the control group. They also reported that PCT as an inflammatory biomarker was more diagnostic than CRP and leukocyte count in dogs with Ehrlichiosis. In the bloodstream, PCT has a half-life of about 25-30

hours (Nakamura et al. 2013, Matur et al. 2021). Different conditions (duration and severity) associated with diseases affect procalcitonin levels (Schuetz et al. 2012, Seo et al. 2015, Sitar et al. 2019, Cho et al. 2021). In this study, no distinction was made between acute and chronic diseases in the Ehrlichia group. Only dogs with clinical and laboratory findings of active disease (non-subclinical) were included in the study. Therefore, the disagreement between studies may be related to the stage of the disease. In addition, the severity of the disease, study population, bacterial load and sepsis may also have contributed to this difference.

To our knowledge, there is only one study of Cp concentration in dogs with Ehrlichiosis. That study was also carried out experimentally. Munhoz et al. (2012) indicate that the ceruloplasmin level increased gradually on the 3rd day after inoculation, peaked on the 6th and 12th days, and decreased substantially until the 30th. Also, Cp concentrations on the 6th and 12th days were significantly higher than in the control group. They reported that Cp levels were elevated before clinical signs and laboratory findings and could be an early indicator of the onset of inflammatory processes. Our study showed no statistically significant difference between serum Cp concentrations of the healthy and Ehrlichia groups. In contrast to the above study, this study included naturally infected dogs, and all dogs had clinical and laboratory findings. In CME, mild clinical and laboratory findings appear 8-20 days after exposure (Rikihisa et al. 1994). Therefore, the difference between the results of the studies may be related to dogs being in different periods of the disease and the study design.

There are several limitations to this study. First, the relatively low number of dogs included in the study. Many dogs with Ehrlichiosis were excluded from the study because of concomitant diseases (e.g. leishmaniasis, dirofilariasis and hemotropic mycoplasmas). Second, the diagnosis of Ehrlichiosis in dogs was made only with point-of-care test kits.

However, these tests had 97.1% sensitivity and 95.3% specificity for *Ehrlichia* spp. In addition, these dogs had clinical and laboratory findings related to active disease. Third, CRP, PCT and Cp concentrations were analysed from blood taken from dogs at the initial examination and are based on a single measurement.

CONCLUSION

In conclusion, our data suggest that serum CRP concentration is increased in dogs naturally infected with *Ehrlichia* spp., and serum CRP concentration could be used as a helpful biomarker for determining the inflammatory processes in dogs with Ehrlichiosis. However, more detailed studies are needed to assess serum PCT and Cp concentrations and reveal their clinical roles in dogs infected with *Ehrlichia* spp.

REFERENCES

Abiramalatha T, Santhanam S, Mammen JJ, Rebekah G, Shabeer MP, Choudhury J, Nair SC. Utility of neutrophil volume conductivity scatter (VCS) parameter changes as sepsis screen in neonates. *J Perinatol.* 2016; 36(9):733-738.

Aktas M, Özübek S. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in dogs from Turkey inferred by TRP36 sequence analysis and phylogeny. *Comp Immunol Microbiol Infec Dis.* 2019; 64:20-24.

Ansari-Mood M, Khoshnegah J, Mohri M, Rajaei S. Seroprevalence and risk factors of *Ehrlichia canis* infection among companion dogs of Mashhad, North East of Iran, 2009–2010. *J Arthropod Borne Dis.* 2015; 9:184-194.

Asawakarn S, Sirisawadi S, Kunasut N, Kamkong P, Taweethavonsawat P. Serum protein profiles and C-reactive protein in natural canine filariasis. *Vet World.* 2021; 14(4):860.

Asawapattanakul T, Pintapagung T, Piratae S, Juntautsa S, Chancharoen P. Erythrocyte sedimentation rate, C-reactive protein, and interleukin-6 as inflammatory biomarkers in dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet World.* 2021; 14(9):2325-2331.

Ayan A, Orunc Kilinc O, Erdogan S, Akyildiz G, Bia MM, Lee D. High prevalence of *Ehrlichia canis* in dogs in Van, Turkey. *Appl Ecol Env Res.* 2020; 18:1953-1960.

Bassetti M, Russo A, Righi E, Dolso E, Merelli M, D'Aurizio F, Sartor A, Curcio F. Role of procalcitonin in bacteremic patients and its potential use in predicting infection etiology. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019; 17:99-105.

Battaglia F, Meucci V, Tognetti R, Bonelli F, Sgorbini M, Lubas G, retti C, Intorre L. Procalcitonin Detection in Veterinary Species: Investigation of Commercial ELISA Kits. *Animals.* 2020; 10:1511.

Bhadesiya CM, Raval SK. Hematobiochemical changes in ehrlichiosis in dogs of Anand region, Gujarat. *Vet World.* 2015; 8:713-717.

Cerón JJ, Martínez-Subiela S. An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res.* 2004; 35:671-679.

Cho JG, Oh YI, Song KH, Seo KW. Evaluation and comparison of serum procalcitonin and heparin-binding protein levels as biomarkers of bacterial infection in cats. *J Feline Med Surg.* 2021; 23(4):370-374.

Chomel B. Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat. *Vet Parasitol.* 2011; 179:294-301.

Cray C, Zaias J, Altman NH. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med.* 2009; 59:517-526.

de Castro MB, Machado RZ, de Aquino LP, Alessi AC, Costa MT. Experimental acute canine monocytic Ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Vet Parasitol.* 2004; 119:73-86.

Duzlu O, Inci A, Yildirim A, Onder Z, Ciloglu A. The investigation of some tick-borne protozoon and rickettsial infections in dogs by Real Time PCR and the molecular characterisations of the detected isolates. *Ankara Univ Vet Fak Derg.* 2014; 61 275-282.

Easley F, Holowaychuk MK, Lashnits EW, Nordone SK, Marr H, Birkenheuer AJ. Serum procalcitonin concentrations in dogs with induced endotoxemia. *J Vet Intern Med.* 2020; 34:653-658.

Fonseca JP, Bruhn FRP, Ribeiro MJM, Hirsch C, Rocha CMBM, Guedes E, Guimarães AM. Haematological Parameters and Seroprevalence of *Ehrlichia canis* and *Babesia vogeli* in Dogs. *Ciênc Anim Bras.* 2017; 18:1-9.

Goggs R, Milloway M, Troia R, Giunti M. Plasma procalcitonin concentrations are increased in dogs with sepsis. *Vet Rec Open.* 2018; 5(1):e000255.

Harrus S, Waner T. Diagnosis of canine monocytotropic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): an overview. *Vet J* 2011, 187:292-296.

Jaheen AH, Kubesy AA, Rakha GM, Salem SI, El-Sherif MA. Diagnostic value of procalcitonin, C-reactive protein, and leukocyte count in canine Ehrlichiosis and canine demodicosis. *Comp Clin Pathol.* 2022; 1-8.

Karnezi D, Ceron JJ, Theodorou K, Leontides L, Siarkou VI, Martinez S, varijonaviciute A, Harrus S, Koutinas CK, Pardali D, Mylonakis ME. Acute phase protein and antioxidant responses in dogs with experimental acute monocytic Ehrlichiosis treated with rifampicin. *Vet Microbiol.* 2016; 184:59-63.

Liu HH, Guo JB, Geng Y, Su L. Procalcitonin: present and future. *Ir J Med Sci.* 2015; 184:597- 605.

Maggi RG, Krämer F. A review on the occurrence of companion vector-borne diseases in pet animals in Latin America. *Parasit Vectors.* 2019;12:145.

Matur E, Dokuzeylül B, Özcan M, Çetinkaya H, Arslan M, Or E, Erhan S, Çötelioglu Ü. Can procalcitonin be used as a clinical biomarker during bacterial, viral and parasitic infections in dogs?. *Jpn J Vet Res.* 2021; 69:5-17.

Meisner M. Update on procalcitonin measurements. *Ann Lab Med.* 2014; 34:263-273.

Moonarmart W, Sungpradit S, Rawangchue T, Suphaphiphat K, Suksusieng S, Jirapattharasate C. Clinical history and haematological findings among canines with monocytic Ehrlichiosis. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 2014; 45:157-166.

Munhoz TD, Faria JLM, Vargas-Hernandez G, Fagliari JJ, Santana ÁE, Machado RZ, Tinucci-Costa M. Experimental *Ehrlichia canis* infection changes acute-phase proteins. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2012; 21(3):206-212.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 2004; 168:28-40.

Mylonakis ME, Ceron JJ, Leontides L, Siarkou VI, Martinez S, Tvarijonaviciute A, Koutinas AF, Harrus S. Serum acute phase proteins as clinical phase indicators and outcome predictors in naturally occurring canine

monocytic Ehrlichiosis. *J Vet Intern Med.* 2011; 25:811-817.

- Mylonakis ME, Harrus S, Breitschwerdt EB.** An update on the treatment of canine monocytic Ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Vet J.* 2019; 246:45-53.
- Nakamura M, Kono R, Nomura S, Utsunomiya H.** Procalcitonin: mysterious protein in sepsis. *J Basic Clin Med.* 2013; 2(1):7-11.
- Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H.** C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci.* 2008; 70(2):127-131.
- Pardo-Marin L, Ceron JJ, Tecles F, Baneth G, Martínez-Subiela S.** Comparison of acute phase proteins in different clinical classification systems for canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2020; 219:109958.
- Reitman AJ, Pisk RM, Gates JV, Ozeran JD.** Serial procalcitonin levels to detect bacteremia in febrile neutropenia. *Clin pediatr.* 2012; 51(12):1175-1183.
- Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G, Mott J, Chichanasiriwithaya W.** C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(4):912-917.
- Schmidt EMS, Eckersall PD.** Acute phase proteins as markers of infectious diseases in small animals. *Acta Veterinaria.* 2015; 65:149-161.
- Schuetz P, Briel M, Christ-Crain M, Stolz D, Bouadma L, Wolff M, Luyt CE, Chastre J, Tubach F, Kristoffersen KB, Wei L, Burkhardt O, Welte T, Schroeder S, Nobre V, Tamm M, Bhatnagar N, Bucher HC, Mueller B.** Procalcitonin to guide initiation and duration of antibiotic treatment in acute respiratory infections: an individual patient data meta-analysis. *Clin Infect Dis.* 2012; 55(5):651-662.
- Schuetz P, Daniels LB, Kulkarni P, Anker SD, Mueller B.** Procalcitonin: A new biomarker for the cardiologist. *Int J Cardiol.* 2016; 223:390-397.
- Seo M, Lee H, Song R, Park C, Park J.** Evaluating of serum procalcitonin as a biomarker in patients with inflammatory disease. *Korean Soc Vet Clin Med.* 2015; 32:56-57.
- Shimada T, Ishida, Y, Shimizu M, Nomura M, Kawato K, Iguchi K, Jinbo T.** Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Vet Res Commun.* 2002; 26(3):171-177.
- Singh J, Srivastava M, Gupta K, Sudan V, Srivastava A, Sharma B.** Alteration in Serum Concentration of Canine C-Reactive Protein (CRP) Associated with Canine Monocytic Ehrlichiosis (CME) and its Amelioration by Conventional Treatment. *J Anim Res.* 2021; 11(4):611-617.
- Sitar ME, Ipek BO, Karadeniz A.** Procalcitonin in the diagnosis of sepsis and correlations with upcoming novel diagnostic markers. *Int J Med Biochem.* 2019; 2(3):132-140.
- Sunderman FW, Numato S.** Measurement of human serum ceruloplasmin by its p-phenylene diamine oxidase activity. *Clin Chem.* 1970; 16:903-910.
- Waritani T, Cutler D, Chang J.** Development of canine C-reactive protein assays. *Acta Vet Scand.* 2020; 62:50.
- Yilmaz Z, Ilcol YO, Ulus IH.** Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med.* 2008; 36:828-833.

Evaluation of Some Trace Element Levels in Serum and Claw Tissue in Cattle with Different Claw Lesion

Burak KESGİN^{1*}, Musa KORKMAZ¹

¹Department of Surgery, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabhisar, Türkiye

ABSTRACT

The aim of this study was to compare levels of serum and claw tissue chromium (Cr), manganese (Mn), iron (Fe), cobalt (Co), copper (Cu), zinc (Zn) and selenium (Se) in healthy cattle with various claw lesions and to evaluate the relationship between claw lesion and trace element levels. A total of 40 cattle were used as 10 healthy cattle and 30 cattle with claw lesions in the study. Hoof conformation measurements and hoof hardness values were determined in both healthy cattle and cattle with claw lesions. Blood and claw tissue samples (hoof wall and solar hoof) were taken to determine serum and claw tissue trace element levels in both groups. Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn and Se levels were analysed in serum and claw tissue samples. It was determined that the hardness value of the solar in the cattle with hoof lesions was higher than the healthy cattle. Cr, Mn, Fe, Co and Se levels in *paries unguulae* were found to be higher in the cattle with claw lesions, compared to the healthy cattle, while the Cu level of *paries unguulae* was statistically significantly higher in the healthy cattle compared to the cattle with claw lesions. In healthy cattle; Cr, Zn and Cu levels in sola unguulae hoof tissue were higher than the cattle with claw lesions, while the Mn, Fe, Co and Se concentrations were lower than in those cattle with claw lesions. As a result, it was observed that Cu and Zn levels of the solar hoof in cattle with claw lesions were lower than in the healthy cattle. It can be suggested that trace elements such as Mn, Zn, Cu ve Se are very important for hoof health, and low levels of Cu and Zn in the solar hoof can increases rate of claw lesions in cattle with claw lesions.

Key words: Cattle, claw lesion, copper, zinc, selenium

Farklı Tırnak Lezyonu Bulunan Sığırlarda Serum ve Tırnak Dokusu Bazı İz Element Düzeylerinin Değerlendirilmesi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı; sağlıklı ve çeşitli tırnak lezyonu bulunan sığırlarda serum ve tırnak dokusu krom (Cr), manganez (Mn), demir (Fe), kobalt (Co), bakır (Cu), çinko (Zn) ve selenyum (Se) düzeylerinin karşılaştırılması ve tırnak lezyonu ile iz element düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir. Çalışmada 10 sağlıklı sığır ve 30 tırnak lezyonu bulunan sığır olmak üzere toplam 40 sığır kullanıldı. Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırların tırnak uzunluk ölçüleri ve tırnak sertlik değerleri belirlendi. Her iki grupta serum ve tırnak dokusu iz element düzeylerinin belirlenebilmesi için kan ve tırnak dokusu (tırnak tabanı ve duvarı) örnekleri alındı. Serum ve tırnak dokusu örneklerinde; Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn ve Se seviyeleri analiz edildi. Lezyonlu tırnağa sahip sığırların tırnak tabanı sertlik değerinin sağlıklı sığırlara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Lezyonlu tırnağa sahip sığırların *paries unguulae* Cr, Mn, Fe, Co ve Se düzeylerinin sağlıklı sığırlara göre yüksek olduğu, sağlıklı sığırların ise *paries unguulae* Cu düzeyinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu saptandı. Sağlıklı sığırların; tırnak dokusu *solea unguulae*, Cr, Zn ve Cu düzeylerinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha yüksek; Mn, Fe, Co ve Se düzeylerinin ise tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak tabanı Cu ve Zn düzeyinin, sağlıklı sığırlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Tırnak sağlığı açısından Mn, Zn, Cu ve Se gibi iz elementlerin oldukça önemli olduğu, tırnak tabanı Cu ve Zn seviyesi düşük olan sığırlarda tırnak lezyonu oranının arttığı söylenebilir.

Anahtar kelimeler: Bakır, çinko, selenyum, sığır, tırnak lezyonu

To cite this article: Kesgin B, Korkmaz M. Evaluation of Some Trace Element Levels in Serum and Claw Tissue in Cattle with Different Claw Lesion. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):182-194

Submission: 29.03.2023 Accepted: 31.05.2023 Published Online: 07.06.2023

ORCID ID; BK: 0000-0002-5271-9821, MK: 0000-0002-7646-0009

*Corresponding author e-mail: kesginburak11@gmail.com

GİRİŞ

Sığır yetiştiriciliğinde karşılaşılan en önemli sağlık problemlerinden birisi topallıktır (Atasoy, 2003; Canpolat ve Bulut, 2003; Borderas ve ark., 2004; Seyrek ve ark., 2008; Yayla ve ark., 2012; Çeçen, 2016). Süt sığırlarında topallık; iştahsızlık, süt veriminin düşmesi, üreme performansının düşmesi ve döl tutmama oranlarının artmasının yanı sıra hayvan refahının bozulmasına yol açmaktadır (Shearer ve ark., 2015; Sun ve ark., 2015). Topallık olgularının % 12'sinin ekstremite ile problemlerden, % 88-90'ının ayak lezyonlarından kaynaklandığı ve bunların % 85'inin arka ayakların lateral tırnaklarında meydana geldiği düşünülmektedir. Ayak hastalıklarının etiolojisinde mevsim gibi çevresel faktörler ile laktasyon, canlı ağırlık, yaş ve genetik yapı gibi bireysel faktörlerin yanı sıra; sürü büyüklüğü, bakım koşulları, beslenme ve zemin yapısını kapsayan işletmeye ait birçok faktör yer almaktadır (Atasoy, 2003).

İz elementler, kaliteli tırnak kapsülü ve tırnağın sağlıklı uzaması için gereklidir (Nouri ve Ashrafi-Helan, 2013). Mineraller, hayvanların üremesinde de önemli rol oynayan temel besinlerdir, bunların fazlalığı veya eksikliği, hayvanın performansı üzerinde negatif bir etki yaratır (Akhtar ve ark., 2009). Süt sığırlarında, kalsiyum (Ca), demir (Fe), bakır (Cu), çinko (Zn), iyot (I), selenyum (Se), molibden (Mo) ve krom (Cr) tırnak gelişimi ile yakından ilişkilidir (Sun ve ark., 2015; Langova ve ark., 2020). Manganez (Mn), kobalt (Co), Zn ve Cu gibi iz elementler protein sentezi, vitamin metabolizması, hormon üretimi, enzim aktivitesi, bağ dokusu ve kollajen oluşumu, oksijen taşıma, kimyasal enerji üretimi ve bağışıklık fonksiyonu üzerine önemli rolleri vardır (Greene ve ark., 1998; Ballantine ve ark., 2002; Siciliano-Jones ve ark., 2008; Karkoodi ve ark., 2012; Zhao ve ark., 2015). Bu iz elementler sığırlarda, vücut kondisyonunu ve sağlığını, büyümeyi, tırnak bütünlüğü, gebeliği, laktasyon ve bağışıklık fonksiyonlarını da olumlu yönde etkiler (Greene ve ark., 1998; Siciliano-Jones ve ark., 2008).

Çinko; keratinizasyon aşamalarında anahtar rol oynaması, hücreler arasında ve hücre içinde bulunması, birçok temel fonksiyonda görev almasından dolayı, tırnak büyüme oranında oldukça etkili bir iz elementtir (Akin, 2008; Assis ve ark., 2017; Langova ve ark., 2020). Zn keratin üretimi ve epitel doku bütünlüğünü sağlar. Keratinizasyon aşamasında yapısal proteinlerin formasyonu için en fazla gereken elementtir (Akin, 2008; Lean ve ark., 2013). Cu, Zn ve Mn iz element eksiklikleri, tırnak keratinizasyonunda rol oynayan hücreler arası bağlayıcı maddeyi oksidatif strese karşı yatkın hale getirir. Keratinleşmeyi sağlayan tırnak hücrelerinde en önemli enzim tiol oksidazdır (Lean ve ark., 2013). Cu lizil ve tiol oksidazın anahtar bir bileşen oluşturmaları sağlıklı tırnak kapsülü üretimi için önemlidir (Lean ve ark., 2013; Langova ve ark., 2020). Se ile tırnağın gerilme gücü arasında pozitif bir ilişki olduğu aktarılmaktadır. Se, keratin

proteinlerinin bağlanmasına bağlı olarak şekillenen oksidatif hasardan tırnak yapısını korumada rol oynar. Zn dâhil olmak üzere diğer bahsedilen iz elementlerin hiçbirisinin, tırnağın gerilme gücü üzerine önemli bir etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. Se, lipidler açısından zengin olan keratinositlerin hücreler arası maddesini korur ve devamlılığını sağlar (Langova ve ark., 2020).

Bu çalışmanın amacı; sağlıklı ve çeşitli tırnak lezyonu bulunan sığırlarda serum ve tırnak dokusu Cr, Mn, Fe, Co, Cu, Zn ve Se düzeylerinin karşılaştırılması ve tırnak lezyonu ile iz element düzeyleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesidir.

MATERYAL ve METOT

Çalışmaya, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 25.12.2019 tarih ve 179 sayılı izni ile başlandı. Bu çalışma, Konya'da bulunan özel bir sığır işletmesinde gerçekleştirildi. Çalışmaya dâhil edilecek sığırlar, işletmenin izlenim programı üzerinden, aranan özelliklere uygun şekilde seçildi ve seçilen hayvanların aynı laktasyon periyodu içerisinde olmasına özen gösterildi.

Çalışmada sığırlar sağlıklı sığırlar ve tırnak lezyonunu bulunan sığırlar olmak üzere iki gruba ayrıldı. Çalışmada; 2-5 yaşları arasında değişen 10 sağlıklı sığır, 30 tırnak lezyonu bulunan sığır olmak üzere toplam 40 dişi sığır kullanıldı. Her iki grupta bulunan hayvanların tırnak muayenesi yapılmadan önce bütün hayvanlar, topallık skoru için serbest olarak yürütüldü ve gözlemlendi. Çalışmaya dâhil edilen bütün hayvanların topallık skorlaması Zhao ve ark. (2015)'nin, bildirdiği skorlama sistemine göre yapıldı ve topallık skorları kaydedildi (Tablo 1).

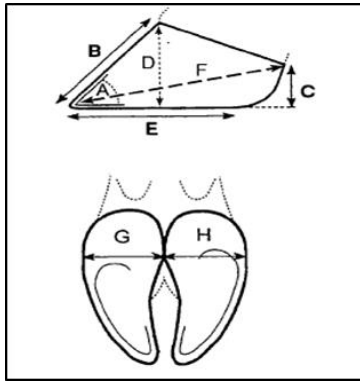
Tablo 1. Topallık değerlendirme kriterleri (Zhao et al., 2015).

Table 1. Lameness evaluation criteria (Zhao ve ark., 2015)

Skor	Kriter
1	Düzenli ve uyumlu yürüyüş, sırt çizgisi düz, üniform adımlar
2	Hafif düzensiz yürüyüş, eklemelerde hafif tutukluk, gözle görülür bir topallık yok
3	Düzensiz yürüyüş, sırt çizgisi kambur, hafif topallık mevcut
4	Kafa sallama belli, sırt çizgisi tamamen kamburlaşmış, belirgin topallık mevcut
5	Yürümekte oldukça zorlanıyor, sırt çizgisi çok fazla kamburlaşmış, şiddetli topallık mevcut

Tırnakların muayene edilebilmesi için sığırlar için özel olarak üretilmiş travaya alındı. Travaya alınan sığırların topallık bulunan ilgili arka ayağı yukarı kaldırılarak sabitlendi. Tırnak üzerinde bulunan dışkı ve toprak gibi yabancı cisimler yıkanarak ve fırçalanarak uzaklaştırıldı ve tırnaklar tamamen temizlendi. Bu aşamadan sonra dikkatli bir tırnak muayenesi yapılarak tırnak lezyonunun tanısı konuldu ve kaydedildi.

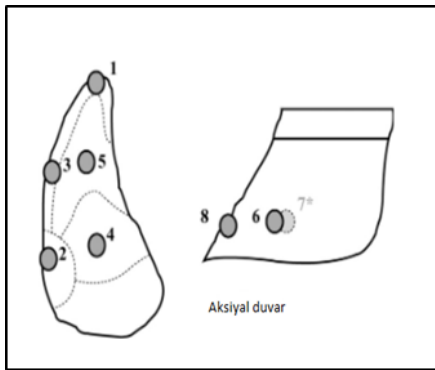
Tırnakların muayenesi sırasında, tırnağın Şekil 1’de verilen belirli uzunluk ölçüleri metal, bükülebilir bir cetvel ile ölçülüp not edildi. Tırnak ölçüleri belirlendikten sonra, Borderas ve ark., (2004) bildirdiği metoda göre tırnağın 6 bölgesinin sertlik değerleri (Şekil 2), sertlik ölçer (durometre) cihazı (Loyka, Shore-D, LXD-D) ile ölçülerek not edildi.



Şekil 1. Tırnak ölçülerinin belirlenmesinde kullanılan diyagram (Vermunt ve Greenough, 1995).

Figure 1. Diagram of various traits to describe claw conformation.

A. Ayak açısı; B. Dorsal duvarın uzunluğu; C. Ökçe yüksekliği; D. Tırnak yüksekliği; F. Diyagonal uzunluk; G. Lateral tırnağın genişliği; H. Medial tırnağın genişliği



Şekil 2. Tırnak sertliğinin değerlendirilmesinde kullanılan ölçüm noktaları (Borderas ve ark., 2004)

Figure 2. Measuring points used in the assessment of claw hardness

1. bölge: Tırnağın ucunda yer alan bölge; tırnak kenarı ile beyaz çizgi arasında kalan kısım.
2. bölge: Abaksiyal tırnak duvarı ile tabanın birleşme yerinde, beyaz çizgi ile tırnak kenarı arasında kalan bölge.
3. bölge: 1. ve 2. kısım arasındaki bölge.
4. bölge: Taba ile ökçe birleşme noktasındaki orta kısım.
5. bölge: Tırnak tabanının apeksinin orta kısmı.
6. bölge: Tabandan 2 cm yukarıda abaksiyal duvarda ökçe ile tabanın birleşme noktası ve tırnağın ön ucunun arasında kalan orta kısım.
8. bölge: Tabandan 2 cm yukarıda tırnağın ön dorsal duvarı

Tırnak ölçüleri ve sertliği belirlendikten sonra, hayvanların lezyonlu tırnaklarının düzeltilmesi gereken yerleri temiz bir renet ve tırnak spirali ile kesilip düzeltildi. Arka ayak lateral tırnağın *paries unguis* (lateral veya ön duvarı) ve *solea unguis*’ından (tırnak tabanı) en az 300-500 mg olacak şekilde tırnak örnekleri alındı. Sağlıklı sığırların da tırnak muayeneleri yapıldı ve lezyon bulunmayan tırnaklardan, tırnak kesme pensi ve renet yardımıyla *solea unguis* ve *paries unguis*’den tırnak örnekleri alındı. Alınan tırnak doku örnekleri üzerinde makroskopik olarak gözle görülen kir, pislik, dışkı kalıntıları temizlendi. Alınan dokuların yerle ve çevre ile kontaminasyonu minimal düzeye indirilip tırnak dokuları kaba konmadan önce % 99,5 aseton, % 96 etanol ve damıtılmış su ile ayrı ayrı durulandı ve kaplara konuldu. Analiz yapılncaya kadar tırnak örnekleri -20 °C’de saklandı. Çalışmaya dâhil edilen bütün hayvanların *vena jugularis*’lerinden bir kanül yardımıyla steril koşullar altında jelli tüp içine kan örnekleri alındı. İşlemler bittikten sonra alınan kanların serumlarının çıkartılması için taşınabilir santrifüj cihazı ile 5 dakikada 5000 devirde santrifüj edildi. Elde edilen kanların serumları, iz element ölçümleri yapılncaya kadar -20 °C’de saklandı. İşletmede bulunan yemlerin içerdikleri iz element miktarlarını belirlemek için, yemlerden örnekler alındı. Alınan bütün kan, tırnak dokusu ve yem örneklerinde iz element ölçümleri (Cr, Fe, Mn, Co, Cu, Zn ve Se) Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Veteriner Teşhis ve Analiz Laboratuvarı’nda gerçekleştirildi.

Serum Örneklerinin İz Element Ölçümü İçin Hazırlanması

Serum örnekleri -20 °C’den alınıp +4°C’de çözünmesi için bekletildi. Bir pipetle yardımıyla alınan 0,5 ml serum örneği krozeye boşaltıldı. Daha sonra üzerine 8 ml % 65’lik nitrik asit (HNO₃) eklendi. Sonrasında yakma işlemi için SINEO MDS 10 Modelli yakma fırınına konuldu. 130 °C’de 10 dk, 150 °C’de 5 dk, takiben 180 °C’de 10 dk bekletildi. İşlemler bittikten sonra cihazın soğuması için 30 dk bekletildi. Daha sonra 25 ml’lik balon jopenin içerisine boşaltıldı. Takiben üzerine 25 ml tamam dolacak şekilde ultra distile su ilave edildi. İşlem sonrası +4 °C’ de saklanmak üzere cam tüplere konulup muhafaza edildi.

Tırnak Örneklerinin İz Element Ölçümü İçin Hazırlanması

Tırnak örnekleri -20 °C’den alınıp +4 °C’de çözünmesi için bekletildi. Her bir teflona tırnak örneğinden 0,2 gram alındı ve üzerine 8 ml % 65’lik nitrik asit (HNO₃) eklendi. Üzerine 1 ml %30’luk hidrojen peroksit (H₂O₂) eklendikten sonra 15-20 dk bekletildi. Teflon kapların kapakları sıkıştırılarak sonrasında yakma işlemi için yakma fırınına (SINEO MDS 10) konuldu.

130 °C'de 10 dk, 150 °C'de 5 dk, takiben 180 °C'de 10 dk bekletildi. İşlemler bittikten sonra cihazın soğuması için 30 dk beklenildi. Daha sonra 25 ml'lik balon jopenin içerisine boşaltıldı. Takiben üzerine 25 ml tamamen dolacak şekilde ultra distile su ilave edildi. Ekofilter adlı süzücüler ile süzme işlemi yapıp tüplere konuldu ve +4 °C'de saklanmak üzere cam tüplere konulup muhafaza edildi.

Yem Örneklerinin İz Element Ölçümü İçin Hazırlanması

Yem örnekleri -20 °C'den alınıp +4 °C'de çözünmesi için bekletildi. 0,5 gr olacak şekilde numuneler alınarak bir kaba konuldu ve üzerine 8 ml % 65'lik HNO₃ eklenip 12 dk bekletildi. Daha sonra üzerine 2 ml nitrik asit (HNO₃) ve 0,5 ml perklorik asit (HClO₄) eklendi. Sonrasında yakma işlemi için SINEO MDS 10 Modelli yakma fırınına konuldu. 130 °C'de 10 dk, 150 °C'de 5 dk, takiben 180 °C'de 10 dk bekletildi. İşlemler bittikten sonra cihazın soğuması için 30 dk beklenildi. Daha sonra 25 ml'lik balon jopenin içerisine boşaltıldı. Takiben üzerine 25 ml tamam dolacak şekilde ultra distile su ilave edildi. İşlem sonrası +4 °C'de saklanmak üzere cam tüplere konulup muhafaza edildi.

Kan, tırnak dokusu ve yemlerden elde edilen çözeltilerde iz element olarak Cr, Mn, Fe, Co, Zn, Cu ve Se seviyeleri ICP-MS cihazı ile (Agilent Technologies 7700 Series ICP-MS) ölçüldü. Minimum tespit limiti 0,001 ppb olacak şekilde sonuçlar ppb cinsinden değerlendirildi. 0,001 ppb'nin altında olan değerler ICP-MS cihazının belirleyebildiği sınırın altında olduğu için değerlendirmeye alınmadı.

İstatistiksel Analiz

Çalışma kapsamında kan ve tırnak dokusu iz element düzeyleri, tırnak konformasyon verileri ve tırnak sertlik düzeylerinin normallik dağılımları Shapiro-Wilk normallik testi ile analiz edildi. Aynı zamanda kan ve tırnak dokusu iz element düzeylerinden marjinal olan değerler Box-plot grafiği ile belirlenerek, bu değerler istatistiksel değerlendirmeye alınmadı. Normal dağılmayan verilerin logaritmik transformasyonları yapılarak, normal dağılan verilerle birlikte bağımsız Student t testi uygulanarak gruplar arasındaki farklılıklar belirlendi. Aynı zamanda kan ve tırnak dokusu iz element düzeyleri arasında bir korelasyon olup olmadığı Spearman's korelasyon testi ile belirlendi. Tablolarda veriler ortalama±standart sapma olarak verildi ve önemlilik derecesi p<0,05 olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya dâhil edilen sağlıklı 10 sığırın, 5'i Holştayn ve 5'i Simental ırkı sığırlardı. Lezyonlu tırnağa sahip 30 sığırın, 24'ü Holştayn ve 6'sı Simental ırkı sığırlardı. Çalışmaya dâhil edilen hayvanların ırk, cinsiyet,

topallık ve tırnak lezyonu skorlamaları Tablo 2'de verildi.

Tırnak lezyonu bulunan hayvanlar arasında; 13'ünde (% 43,5) topallık skorunun 2 olduğu, 13'ünde (% 43,5) topallık skorunun 3 ve 4'ünde (% 13) topallık skorunun 4 olduğu tespit edildi. Topallık skoru 2 olan sığırların 6'sında taban ülseri, 1'inde beyaz çizgi hastalığı, 4'ünde ökçe erozyonu, 2'sinde beyaz çizgi hastalığı ile birlikte taban ülseri gözlemlendi. Topallık skoru 3 olan sığırların 7'sinde taban ülseri, 5'inde ökçe erozyonu tespit edildi. Topallık skoru 4 olan sığırların 1'inde beyaz çizgi hastalığı, 3'ünde ökçe erozyonu belirlendi.

Tırnak lezyonu bulunan sığırlarda lezyonların; 14'ü taban ülseri (% 46), 12'si ökçe erozyonu (% 40) ve 2'si beyaz çizgi hastalığı (% 7) şeklinde dağılım gösterdiği tespit edildi. Lezyon bulunan sığırların 2'sinde taban ülseri ve ökçe erozyonu birlikte (% 7) tespit edildi.

Tırnak sertliği bakımından, yöntemde açıklanan şekilde hem sağlıklı hem de lezyonlu tırnağa sahip sığır gruplarında çeşitli tırnak bölgelerinin tırnak sertlikleri ölçüldü ve elde edilen sertlik değerleri Tablo 3' de verildi. Tırnak sertlik değerlerinin sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda 1., 2., 4. ve 6. bölgelerde birbirine yakın olduğu, 3. bölgede tırnak sertliğinin lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda, sağlıklı sığırlara göre daha yüksek olduğu, diğer taraftan 8. bölgede ise tırnak sertliğinin sağlıklı sığırlarda, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Ancak tırnak sertlik düzeyleri açısından bütün tırnak bölgelerinde sağlıklı ve lezyonlu sığırlar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark belirlenmedi (p>0,05).

Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak konformasyon ölçüleri Tablo 4'de verildi. Tırnak konformasyonu açısından değerlendirildiğinde; sağlıklı sığırlarda bütün bölgelerde tırnak ölçülerinin lezyonlu sığırlara göre daha kısa olduğu belirlendi. Aynı zamanda 1, 3, 4 ve 5. bölgelerde tırnak uzunluk ölçüleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlemlendi (p<0,05).

Çalışmaya dâhil edilen hayvanların hepsi, mısır slajı, buğday samanı, yonca, konsantre karma yem, pancar posası, buğday posası, korunmuş protein, protein karması, maya ve premiks içerikli toplam karma yemle ad libitum olarak besleniyordu. Bu yemlere ait iz element düzeyleri Tablo 5'de verildi.

Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda serum ve tırnak dokusu iz element düzeyleri Tablo 6'da verildi.

Lezyonlu tırnağa sahip sığırların *paries ungulae* Cr, Mn, Fe, Co ve Se düzeylerinin sağlıklı sığırlara göre yüksek olmasına rağmen, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı gözlemlendi (p>0,05). Sağlıklı sığırların *paries ungulae* Cu düzeyinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu tespit edildi (p<0,05).

Sağlıklı sığırların *Solea ungulae*, Cr, Cu, ve Zn düzeylerinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Cu düzeyi açısından

gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$).

Sağlıklı sığırların *solea unguulae*, Mn, Fe, Co ve Se düzeylerinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara grubuna göre daha düşük olduğu tespit edildi. Se düzeyleri açısından gruplar arasında gözlenen farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,05$), gruplar arasında Mn, Fe, Co ve Mn düzeyleri arasındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olmadığı belirlendi ($p > 0,05$).

Bütün hayvanlarda, serum Cr ve Mn seviyeleri ICP-MS cihazının tespit edebildiği düzeyin altında belirlendi ($< 0,0001$ ppb). Bu bakımdan serum Cr ve Mn düzeyleri istatistiksel analize dâhil edilmedi ve tablolarda verilmedi. Sağlıklı sığırların, serum Fe düzeyinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha yüksek olduğu belirlendi. Sağlıklı sığır serum Co, Cu, Zn ve Se düzeylerinin tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha düşük olduğu saptandı ($p > 0,05$).

Tablo 2. Çalışmaya dâhil edilen hayvanlarda ırk, topallık skoru ve tırnak lezyonları
Table 2. Breed, lameness score and claw lesions in animals included in the study

Protokol No	İrk	Topallık Skoru	Arka Ayak Lezyonu
S1	Simental	0	Lezyon yok
S2	Simental	0	Lezyon yok
S3	Holştayn	0	Lezyon yok
S4	Simental	0	Lezyon yok
S5	Simental	0	Lezyon yok
S6	Holştayn	0	Lezyon yok
S7	Holştayn	0	Lezyon yok
S8	Simental	0	Lezyon yok
S9	Holştayn	0	Lezyon yok
S10	Holştayn	0	Lezyon yok
L1	Holştayn	3	Taban Ülseri
L2	Holştayn	4	Beyaz Çizgi Hastalığı
L3	Holştayn	2	Beyaz Çizgi Hastalığı Taban Ülseri
L4	Holştayn	3	Taban Ülseri
L5	Holştayn	2	Taban Ülseri
L6	Simental	3	Taban Ülseri
L7	Holştayn	3	Taban Ülseri
L8	Holştayn	3	Taban Ülseri
L9	Holştayn	4	Ökçe Erozyonu
L10	Simental	3	Taban Ülseri
L11	Simental	2	Taban Ülseri
L12	Simental	2	Taban Ülseri
L13	Holştayn	2	Ökçe Erozyonu
L14	Holştayn	3	Taban Ülseri
L15	Simental	2	Taban Ülseri
L16	Holştayn	2	Ökçe Erozyonu
L17	Holştayn	2	Ökçe Erozyonu
L18	Holştayn	2	Ökçe Erozyonu
L19	Simental	2	Taban Ülseri
L20	Holştayn	3	Ökçe Erozyonu
L21	Holştayn	3	Ökçe Erozyonu
L22	Holştayn	2	Taban Ülseri
L23	Holştayn	2	Beyaz Çizgi Hastalığı Taban Ülseri
L24	Holştayn	3	Ökçe Erozyonu
L25	Holştayn	4	Ökçe Erozyonu
L26	Holştayn	4	Ökçe Erozyonu
L27	Holştayn	3	Ökçe Erozyonu
L28	Holştayn	3	Taban Ülseri
L29	Holştayn	2	Beyaz Çizgi Hastalığı
L30	Holştayn	3	Ökçe Erozyonu

Tablo 3. Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırların çeşitli tırnak bölgelerine göre tırnak sertliğinin dağılımı (Ort±SS)
Table 3. Distribution of claw hardness of cattle with healthy and claw lesions according to various claw areas (Mean±SD)

Tırnak bölgesi	Sağlıklı sığır tırnağı (n=10) (Newton)	Lezyonlu sığır tırnağı (n=30) (Newton)
1. bölge	30,67±5,76	31,88±8,62
2. bölge	31,17±8,37	29,02±8,67
3. bölge	28,50±5,29	35,58±10,17
4. bölge	26,39±5,44	25,18±6,83
5. bölge	29,39±4,45	29,35±9,74
6. bölge	43,83±7,97	46,04±14,04
8. bölge	46,78±9,17	38,83±14,63

Tablo 4. Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak konformasyon verileri (Ort±SS)
Table 4. Claw comformation data in cattle with healthy and claw lesion (Mean±SD)

Tırnak bölgesi	Sağlıklı sığır tırnağı (cm) (n=10)	Lezyonlu sığır tırnağı (cm) (n=30)	<i>p</i>
1. bölge (B)	7,44±0,52 ^a	9,31±0,97 ^b	0,001
2. bölge (C)	4,30±0,24	4,55±0,88	0,61
3. bölge (E)	12,71±0,59 ^a	13,75±1,28 ^b	0,01
4. bölge (G)	3,80±0,2 ^a	5,60±0,44 ^b	0,001
5. bölge (H)	3,55±0,18 ^a	5,91±0,46 ^b	0,001

^{ab}Gruplar arasındaki farklılığı göstermektedir.

B: Dorsal duvarın uzunluğu, C: Ökçe yüksekliği, E: Taban uzunluğu G: Lateral tırnağın genişliği H: Medial tırnağın genişliği

Tablo 5. Günlük rasyonda kullanılan yemlerin iz element düzeyleri
Table 5. Trace element levels of feed used in daily ration

Yem türü	Krom (ppb)	Manganez (ppb)	Demir (ppb)	Kobalt (ppb)	Bakır (ppb)	Çinko (ppb)	Selenyum (ppb)
Mısır silajı	38,546	5724,247	11543,942	13,897	579,434	4478,379	
Buğday samanı	286,522	23265,587	37099,064	46,579	2662,004	11327,233	17,236
Yonca	787,11	56816,369	475531,94	348,258	9784,204	15501,282	46,929
Konsantre karma yem	426,528	49917,805	142415,688	158,684	8279,594	51695,028	100,891
Pancar posası	94,979	7004,648	30528,685	14,966	895,186	2591,605	15,766
Buğday posası	182	13682,495	65734,843	29,474	3675,93	10443,665	4,964
Korunmuş protein	1184,172	17897,029	324533,729	103,394	711,491	5980,472	94,318
Protein karması	259,644	21055,43	75443,095	67,961	4736,177	29333,784	72,715
Maya	3344,592	42623,172	135585,334	566,301	3533,258	33728,137	71,06
Premiks	994,969	3824640,232	2211472,692	15706,325	993846,748	3089174,273	14333,71
Ortalama	759,91	406262,70	350988,90	1705,58	102870,40	325425,39	1639,73

Tablo 6. Sağlık ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak dokusu ve serum örneklerinde krom, manganez, demir, kobalt, bakır, çinko ve selenyum düzeyleri (Ort±SS)

Table 6. Chrome, manganese, iron, cobalt, copper, zinc and selenium levels in claw tissue and serum samples in cattle with health and claw lesion (Mean±SD)

	Sağlıklı sığırlar	Lezyonlu sığırlar	<i>p</i>	
Paries Ungulae	Krom (ppb)	145,21±113,00	326,66±374,65 ^a	0,40
	Manganez (ppb)	1872,07±1128,13 ^a	2031,27±1436,74 ^a	0,99
	Demir (ppb)	20923,30±12706,47 ^a	27466,38±16703,53	0,27
	Kobalt (ppb)	40,16±30,51 ^a	56,95±44,66 ^a	0,34
	Bakır (ppb)	5180,24±1643,40 ^{a*}	2453,13±3531,14 [*]	0,002
	Çinko (ppb)	94009,69±20772,62 ^a	95628,76±23516,98 ^a	0,95
	Selenyum (ppb)	253,72±77,01	278,72±115,76 ^a	0,53
Solea Ungulae	Krom (ppb)	409,57±478,06	141,98±222,59 ^b	0,55
	Manganez (ppb)	331,11±280,54 ^b	757,81±811,11 ^b	0,09
	Demir (ppb)	7850,12±7022,95 ^b	19161,88±19354,03	0,09
	Kobalt (ppb)	11,42±7,32 ^b	15,05±15,74 ^b	0,53
	Bakır (ppb)	2025,91±484,98 ^b	1221,44±1715,65 [*]	0,006
	Çinko (ppb)	37376,90±5913,62 ^b	36301,34±11066,36 ^b	0,55
	Selenyum (ppb)	297,02±56,63 [*]	379,70±108,31 ^{b*}	0,02
Kan serumu	Demir (ppb)	2213,91±809,66	1739,40±1161,48	0,26
	Kobalt (ppb)	0,34±0,16	1,17±1,62	0,24
	Bakır (ppb)	287,31±168,44	462,85±318,26	0,10
	Çinko (ppb)	1381,75±889,78	2388,12±2156,20	0,62
	Selenyum (ppb)	49,85±10,50	60,32±15,66	0,05

^{ab}Grup içinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir. Aynı sütunda farklı harf taşıyan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

* Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir.

Sağlıklı sığırların, *paries unguulae* Mn, Fe, Co, Cu v Zn düzeylerinin *solea unguulae*'ye göre istatistiksel açıdan önemli derecede yüksek olduğu saptandı (p<0,05). Tırnak lezyonu bulunan sığırların, *paries unguulae* Cr, Mn, Fe, Co, Cu ve Zn düzeylerinin *solea unguulae*'ye göre daha yüksek olduğu belirlendi. Tırnak lezyonu bulunan sığırların *paries unguulae* ile *solea unguulae* arasında Cr, Mn, Co, Zn ve Se düzeylerinde gözlenen farkın istatistiksel olarak önemli olduğu gözlemlendi (p<0,05).

Sağlıklı sığırların, serum ve tırnak dokusu iz element düzeyleri arasındaki korelasyon katsayıları Tablo 7'de sunuldu. Sağlıklı sığırların, serum Co ve Cu düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu belirlendi (p<0,05).

Sağlıklı sığırların *paries unguulae* Cu düzeyi ile Fe ve Co düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu gözlemlendi (p<0,05). Yine bu sığırlarda serum Fe düzeyleri ile *solea unguulae* Fe ve Co düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edildi (p<0,05).

Sağlıklı sığırların *solea unguulae* ile *paries unguulae* Zn düzeyleri arasında, *solea unguulae* Zn ve Cu düzeyleri

arasında pozitif yönde anlamlı korelasyon olduğu saptandı (p<0,05). (p<0,05).

Tablo 7. Sağlıklı sığırlarda tırnak dokusu ve serum demir, kobalt, bakır, çinko ve selenyum korelasyon katsayıları
Table 7. Iron, cobalt, copper, zinc and selenium correlation coefficients in claw tissue and blood serum in healthy cattle

		Serum Fe	Serum Co	Serum Cu	Serum Zn	Serum Se	PU-Fe	PU-Co	PU-Cu	PU-Zn	PU-Se	SU-Fe	SU-Co	SU-Cu	SU-Zn
Serum Fe	r	1,000													
	p	.													
Serum Co	r	,086	1,000												
	p	,872	.												
Serum Cu	r	,017	,829*	1,000											
	p	,966	,042	.											
Serum Zn	r	,150	-,486	,503	1,000										
	p	,700	,329	,138	.										
Serum Se	r	-,617	-,086	,055	-,188	1,000									
	p	,077	,872	,881	,603	.									
PU-Fe	r	-,017	-,429	-,236	-,248	-,309	1,000								
	p	,966	,397	,511	,489	,385	.								
PU-Co	r	,383	-,200	,382	,370	-,115	,455	1,000							
	p	,308	,704	,276	,293	,751	,187	.							
PU-Cu	r	,000	-,486	-,212	-,127	-,006	,782**	,636*	1,000						
	p	1,000	,329	,556	,726	,987	,008	,048	.						
PU-Zn	r	-,067	,314	-,491	-,600	-,115	,491	-,455	,176	1,000					
	p	,865	,544	,150	,067	,751	,150	,187	,627	.					
PU-Se	r	-,417	-,257	-,018	-,152	,055	,018	-,418	-,055	,236	1,000				
	p	,265	,623	,960	,676	,881	,960	,229	,881	,511	.				
SU-Fe	r	,683*	,257	-,083	-,033	-,567	,350	,317	,333	,317	-,133	1,000			
	p	,042	,623	,831	,932	,112	,356	,406	,381	,406	,732	.			
SU-Co	r	,917**	-,257	,050	,433	-,450	-,133	,533	,067	-,317	-,467	,600	1,000		
	p	,001	,623	,898	,244	,224	,732	,139	,865	,406	,205	,088	.		
SU-Cu	r	,150	-,086	-,406	-,079	-,309	,127	-,152	,091	,358	-,333	,583	,167	1,000	
	p	,700	,872	,244	,829	,385	,726	,676	,803	,310	,347	,099	,668	.	
SU-Zn	r	-,267	,086	-,515	-,515	,042	,103	-,527	-,042	,648*	,127	,283	-,367	,758*	1,000
	p	,488	,872	,128	,128	,907	,777	,117	,907	,043	,726	,460	,332	,011	.
SU-Se	r	-,267	-,314	-,152	,455	,115	-,430	-,273	-,152	-,188	-,006	-,017	,017	,527	,309
	P	,488	,544	,676	,187	,751	,214	,446	,676	,603	,987	,966	,966	,117	,385

*p<0,05 **p<0,001 PU: *Paries unguulae*, SU: *Solea unguulae*

Tırnak lezyonu bulunan sığırların, serum ve tırnak dokusu iz element düzeyleri arasındaki korelasyon katsayıları Tablo 8'de verilmiştir. Tırnak lezyonu bulunan sığırların, serum Zn ile Co, Se ile Cu düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu belirlendi (p<0,05).

Tırnak lezyonu bulunan sığırların, *paries* ve *solea unguulae* Co ile Fe düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu saptandı (p<0,05). Yine tırnak lezyonu bulunan sığırların, *solea unguulae* ile *paries*

ungulae Cu düzeyleri arasında pozitif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu tespit edilirken (p<0,05), *paries unguulae* Cu düzeyi ile *solea unguulae* Zn düzeyleri arasında negatif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu gözlemlendi

Tablo 8. Tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak dokusu ve serum demir, kobalt, bakır, çinko ve selenyum korelasyon katsayıları

Table 8. Iron, cobalt, copper, zinc and selenium correlation coefficients in claw tissue and blood serum in cattle with claw lesion

		Serum Fe	Serum Co	Serum Cu	Serum Zn	Serum Se	PU-Fe	PU-Co	PU-Cu	PU-Zn	PU-Se	SU-Fe	SU-Co	SU-Cu	SU-Zn
rum r		1,000													
Fe p		.													
rum r		,100	1,000												
Co p		,797	.												
rum r		,172	,142	1,000											
Cu p		,401	,715	.											
rum r		-,156	,828**	-,155	1,000										
Zn p		,446	,006	,423	.										
rum r		-,136	,192	,437*	,080	1,000									
Se p		,509	,620	,018	,679	.									
l-Fe r		-,117	-,168	,251	,082	,224	1,000								
p		,596	,691	,248	,710	,304	.								
-Co r		,005	-,243	,167	-,228	,235	,523*	1,000							
p		,983	,529	,425	,274	,259	,010	.							
-Cu r		,114	,216	-,009	-,567**	-,078	-,192	,083	1,000						
p		,595	,608	,964	,003	,705	,404	,708	.						
-Zn r		-,206	,444	,115	,205	-,007	,071	-,059	-,200	1,000					
p		,323	,232	,558	,295	,974	,755	,784	,326	.					
l-Se r		-,079	-,435	-,208	,041	-,199	-,051	-,107	-,261	,155	1,000				
p		,701	,242	,278	,831	,302	,816	,611	,197	,431	.				
l-Fe r		-,155	-,008	-,181	-,157	,180	,285	,062	,321	-,145	-,095	1,000			
p		,461	,983	,365	,434	,369	,198	,774	,117	,481	,639	.			
-Co r		,276	,561	-,144	-,107	,111	,003	,280	,343	-,271	-,240	,502**	1,000		
p		,172	,116	,457	,580	,565	,989	,175	,086	,163	,209	,008	.		
-Cu r		,225	,243	-,042	-,067	-,102	-,140	-,049	,741**	-,214	-,148	,306	,293	1,000	
p		,270	,529	,827	,728	,597	,523	,815	,000	,274	,443	,121	,123	.	
-Zn r		,028	,184	,021	,345	-,075	,229	-,157	-,646**	,164	,161	-,263	-,255	-,322	1,000
p		,891	,635	,915	,067	,698	,293	,454	,000	,404	,405	,185	,181	,089	.
l-Se r		,022	-,059	,062	,060	,262	,466*	-,092	-,269	-,124	-,012	,252	-,009	-,294	,668**
p		,919	,881	,752	,761	,178	,029	,668	,184	,529	,952	,214	,965	,128	,000

p<0,05 **p<0,001 PU: Paries unguiae, SU: Solea unguiae

TARTIŞMA

Galbraith ve ark. (2006), sağlıklı tırnağa sahip sığırlarda dorsal duvarın sertlik değerinin 55,2 N olduğunu bildirmişlerdir. Griffiths ve ark., (2007), tırnak duvarının sertlik değerinin 58 N olduğunu aktarmışlardır. Borderas ve ark. (2004) ise yaptıkları çalışmada, sağlıklı tırnağa sahip sığırlarda tırnak duvarının sertlik değerinin 78,4 N olduğunu tespit etmişler ve tırnağın diğer bölgelerdeki sertlik ortalamalarına göre, tırnak duvarı sertlik değerinin daha fazla olduğu gözlenmiştir. Baggott ve ark. (1988), sağlıklı tırnağa sahip sığırlarda dorsal duvarın sertlik ortalaması 65,5 N iken, lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda 63,4 N olarak aktarmışlardır. Sunulan bu çalışmada, sağlıklı sığırların, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre tırnak dorsal duvarı sertlik değerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Tırnak dorsal duvarı sertliği, sağlıklı tırnağa sahip sığırlarda 46,78 N iken, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda bu değer 38,8 N

olarak belirlendi. Aynı zamanda hem sağlıklı hem de lezyonlu tırnağa sahip sığırların tırnak dorsal duvarının, tırnak tabanına göre daha yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Sunulan bu çalışmada, sağlıklı sığırların tırnak duvarının daha sert olmasının nedeni, kapsül duvarının süspansiyonda etkili bir şekilde çalışması için daha sert ve daha az esnek olması gerektiğinden, taban ve ökçenin ise daha fazla esnek olması kaynaklı olabilir (Galbraith ve ark. 2006). Aynı zamanda, tırnak duvarının tabana göre sert olmasında, tırnak duvarının Zn içeriğinin daha yüksek olmasının etkili olabileceği (Sadeghi ve ark.. 2013) kanısına varıldı.

Sadeghi ve ark. (2013), sağlıklı sığırlarda tırnağın Cu seviyesinin, lezyonlu tırnağa sahip sığırlara göre daha düşük düzeyde olduğunu aktarmışlardır. Kibar ve ark. (2016), sağlıklı sığır grubunda tırnaktaki Cu düzeyinin 0,19 ppm, lezyonlu tırnağa sahip sığır grubunda ise 0,58 ppm olduğunu belirtmekte ve sağlıklı sığır grubunda tırnak dokusu Cu düzeyinin tırnak lezyonu

bulunan sığırlara göre daha düşük düzeyde olduğunu bildirmektedir. Baggott ve ark. (1988), sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı ve tırnak tabanı Cu seviyesinin, lezyonlu tırnağa sahip sığırlara göre daha düşük seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda Cu seviyesinin tırnak duvarında daha fazla olduğunu belirtilmektedir (Baggott ve ark. 1988). Akın (2008), sağlıklı sığırlarda, Cu seviyesinin tırnağın taban bölgesinde 1,1 ppm, beyaz çizgi bölgesinde 1,1 ppm ve ökçe bölgesinde 1,0 ppm olduğunu ve bu Cu düzeyleri ile tırnak bölgesi arasında istatistiksel anlamlı bir fark gözlenmediğini belirtmektedir. Aynı zamanda, lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda Cu seviyesinin, sağlıklı sığırlara göre daha yüksek seviyede olduğunu aktarmaktadır (Akın, 2008). Bu çalışmada, sağlıklı sığırların tırnak duvarı Cu seviyesi 5180,23 ppb iken, tırnak tabanı Cu seviyesinin 2025,91 ppb olduğu belirlendi. Lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda ise Cu seviyesi tırnak duvarında 2453,13 ppb iken, tırnak tabanında 121,44 ppb olarak belirlendi. Diğer çalışmalara (Baggott ve ark. 1988) benzer olarak Cu seviyesinin bu çalışmada da tırnak duvarında, tabandan daha fazla olduğu tespit edildi. Sağlıklı sığırlar ile lezyonlu tırnağa bulunan sığırlar karşılaştırıldığında, diğer çalışmalardan farklı olarak sağlıklı sığırların tırnak dokusu Cu seviyesinin daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada sağlıklı sığırlarda tırnakta daha fazla Cu tespit edilmesi; Cu'nun sağlıklı bir tırnak gelişimi için önemli olması ve keratinizasyon sürecinde etkili bir iz element olması ile açıklanabilir (Lean ve ark.. 2013; Langova ve ark.. 2020).

Korkmaz ve ark. (2020), sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı Zn düzeyinin tabana göre daha yüksek olduğunu aktarmışlardır. Baggott ve ark. (1988), sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda, tırnak duvarı Zn seviyesinin, tırnak tabanı Zn seviyesinden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Sağlıklı ve lezyonlu tırnağa sahip olan sığırlar karşılaştırıldığında, sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı ve tırnak tabanı Zn seviyesinin daha yüksek olduğu belirtilmektedir (Baggott ve ark.. 1988). Kibar ve ark. (2016), sağlıklı sığırlarda tırnak tabanı Zn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak tabanı Zn seviyesinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Sadeghi ve ark. (2013), sağlıklı sığırlarda tırnak dokusu Zn seviyesini, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha yüksek seviyede olduğunu aktarmışlardır. Akın (2008), sağlıklı sığırlarda tırnağın Zn seviyesinin en fazla beyaz çizgi bölgesinde, daha sonra taban ve ökçe bölgesinde bulunduğunu, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda ise tırnakta en yüksek Zn seviyesinin taban ülseri bulunan sığırlarda, daha sonra beyaz çizgi hastalığı ve ökçe erozyonu bulunan sığırlarda olduğunu bildirmektedir. Aynı zamanda tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnağın Zn seviyesinin, sağlıklı sığırlardaki tırnağın Zn seviyesinden daha yüksek olduğunu belirtilmektedir (Akın, 2008). Sunulan bu çalışmada, sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırların tırnak

duvarı ve tırnak tabanı Zn seviyeleri karşılaştırıldığında, tırnak duvarı Zn seviyesinin daha yüksek olduğu belirlendi. Bu çalışmada, diğer çalışmalara benzer şekilde (Baggott ve ark.. 1988; Sadeghi ve ark. 2013) sağlıklı sığırların tırnağın tırnak tabanı Zn seviyesinin tırnak lezyonu bulunan sığırlardan daha yüksek seviyede olduğu belirlendi. Sağlıklı tırnakta Zn seviyesinin yüksek olması, çinkonun tırnak sağlığında destek rolü sağlamasından (Baggott ve ark.. 1988; Langova ve ark.. 2020) kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda bu çalışmada, tırnak duvarı Zn düzeyinin tırnak tabanı Zn düzeyinden daha yüksek olduğu gözlemlendi. Bu veriler de literatür verileriyle örtüşmekte olup (Korkmaz ve ark.. 2020), tırnak duvarının, tabandan daha yüksek düzeyde Zn içeriğine sahip olmasının, tırnak duvarının tırnağa destek sağlamasının yanı sıra, tabana göre daha hızlı büyümesiyle ilgili olduğu düşünülmektedir (Shearer ve ark.. 2005; Shakespeare, 2009; Korkmaz ve ark.. 2020).

Korkmaz ve ark., (2020), sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı ve tabanı Mn seviyelerinin birbirine oldukça benzer olduğunu bildirmişlerdir. Kibar ve ark., (2016), sağlıklı sığırlarda tırnak dokusu Mn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha düşük olduğunu aktarmışlardır. Sağlıklı ve tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak dokusu Mn düzeyleri karşılaştırıldığında, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda Mn seviyesinin daha yüksek olduğu bildirilmektedir (Akın, 2008). Sunulan bu çalışmada, sağlıklı sığırların, tırnak duvarı ve tabanı Mn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha düşük olduğu belirlendi. Sağlıklı sığırların tırnak duvarı ve tırnak tabanı Mn seviyeleri karşılaştırıldığında tırnak duvarı Mn seviyesinin tırnak tabanından yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu tespit edildi. Tırnak duvarı Mn seviyesinin fazla olmasında, Mn'in temel olarak keratinizasyonda etkili olmasından kaynaklandığı düşünüldü (Tomlinson ve ark., 2004; Lena ve ark., 2013).

Baggott ve ark., (1988), sağlıklı ve lezyonlu tırnağa bulunan sığırlarda Se seviyelerini karşılaştırdığında tırnak duvarı ve tırnak tabanında anlamlı bir fark olmadığını, ökçe bölgesinde ise sağlıklı sığırlardaki Se seviyesinin daha düşük olduğunu aktarmışlardır. Besi sığırlarında yapılan bir çalışmada, sağlıklı tırnağa sahip ve tırnak lezyonu bulunan hayvanlar 2 yıl süresince takip edilmiş, sağlıklı sığırlar ile tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak dokusu (hem taban hem de tırnak duvarı) Se içeriğinin birbirine yakın olduğu aktarılmıştır. Aynı çalışmada, sağlıklı hayvanlarda tırnak tabanı ve duvarı Se içeriğinin tırnak lezyonu bulunan hayvanlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir (Jelinski ve ark., 2018). Sunulan bu çalışmada, yukarıdaki literatür verilerine (Jelinski ve ark., 2018) benzer olarak sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı ve tabanı Se seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlara göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Sağlıklı ve tırnak lezyonunun bulunan sığır gruplarında tırnak tabanı Se seviyesinin, tırnak duvarından daha yüksek seviyede olduğu gözlemlendi. Tırnak tabanı Se seviyesinin daha

yüksek olması, Se'un tırnak tabanında gelişen oksidatif hasara karşı tırnak yapısını koruması (Andrieu, 2008) ve böylece daha güçlü ve yüksek kalitede bir tırnak tabanı şekillenmesinde etkili olması ile açıklanabilir.

Sadeghi ve ark., (2013), sağlıklı sığırlarda serum Cu seviyesinin, lezyonlu tırnağı bulunan sığırların serum Cu seviyesinden daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir. Akın (2008), sağlıklı sığırlarda serum Cu seviyesinin, lezyonlu tırnağa sahip olan sığırların serum Cu seviyesinden daha yüksek olduğunu bildirmiştir. Zhao ve ark., (2015), sağlıklı sığırlarda serum Cu seviyesinin lezyonlu tırnağa sahip olan sığırlardan daha yüksek olduğunu gözlemlemiştir. Sun ve ark., (2015), topallık skoru daha az olan sığırlarda serum Cu seviyesinin yüksek, topallık skoru daha yüksek olan sığırlarda ise serum Cu seviyesinin daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, sağlıklı sığır grubunda bulunan serum Cu seviyesi 287,31 ppb iken, lezyonlu tırnağa sahip olan sığır grubundaki serum Cu seviyesini 462,85 ppb olarak bulundu. Diğer çalışmalardan farklı olarak sağlıklı sığırların serum Cu seviyesi daha az tespit edildi.

Zhao ve ark., (2015), sağlıklı sığırlarda serum Zn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlardan daha yüksek seviyede olduğunu aktarmışlardır. Belge ve ark., (2004), sağlıklı sığırlarda serum Zn seviyesinin, topallık bulunan sığırlardan daha fazla Zn seviyesine sahip olduğunu belirtmişlerdir. Kılıç ve ark., (2007), topallığı bulunan sığırlarda serum Zn seviyesinin, sağlıklı sığırlara göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Akın (2008), sağlıklı sığırlarda serum Zn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlardaki serum Zn seviyesinden daha düşük seviyede olduğunu aktarmıştır. Sadeghi ve ark., (2013), sağlıklı sığırlarda serum Zn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlardan daha düşük seviyede olduğunu bulmuşlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediğini bildirmişlerdir. Seyrek ve ark., (2008), sağlıklı, hafif, orta ve şiddetli total süt sığırlarının serum Zn ve Cu seviyelerinde önemli ölçüde bir fark olmadığını aktarmışlardır. Sunulan bu çalışmada, bazı çalışmalara (Akın, 2008; Sadeghi ve ark., 2013) benzer şekilde sağlıklı sığırların serum Zn seviyesinin, tırnak lezyonu bulunan sığırlardan daha düşük seviyede olduğu görüldü.

Sadeghi ve ark., (2013), sığırlarda tırnak dokusu Cu ile Zn seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğunu aktarmışlardır. Korkmaz ve ark., (2020), sağlıklı sığırlarda tırnak duvarı Zn ve Cu seviyesi, Fe ile Cu ve Zn düzeyleri arasında pozitif korelasyon olduğunu belirtmişlerdir. Kibar ve ark., (2016), sağlıklı sığırlarda tırnak dokusu Cu ile Zn düzeyi ve Fe ile Cu ve Zn düzeyleri arasında pozitif bir korelasyonun olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan bu çalışmada, sağlıklı sığır grubunda hem tırnak tabanı hem de tırnak duvarı Cu ile Zn seviyeleri arasında, literatürlere benzer olarak (Sadeghi ve ark., 2013; Kibar ve ark., 2016; Korkmaz ve ark., 2020) pozitif yönde korelasyon olduğu belirlendi. Sağlıklı sığırlarda, literatürde bildirildiği gibi (Kibar ve ark., 2016; Korkmaz ve ark., (2020) tırnak

duvarı Fe ile, Cu ve Zn düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edildi.

Sadeghi ve ark., (2013), tırnak lezyonu bulunan sığırlarda serum Cu ve Zn seviyeleri arasında negatif bir korelasyon olduğu aktarmıştır. Korkmaz ve ark., (2020), sağlıklı sığırlarda serum Cu ve Zn seviyeleri arasında negatif bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Sadeghi ve ark., (2013) tırnak lezyonu bulunan sığırlarda serum Zn seviyesi ile tırnak dokusu Zn seviyesi arasında negatif bir korelasyon olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada, lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda serum Cu seviyesi ile tırnak dokusu Cu seviyesi arasında pozitif bir korelasyon olduğu bildirilmektedir (Sadeghi ve ark., 2013). Korkmaz ve ark., (2020), sağlıklı sığırlarda serum Fe ile Cu ve Zn seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Sunulan bu çalışmada, tırnak lezyonu bulunan sığırlarda, serum Zn ile Cu seviyeleri arasında literatüre benzer olarak (Sadeghi ve ark., 2013) negatif yönde anlamlı bir korelasyon olduğu belirlendi. Tırnak lezyonu bulunan sığırlarda, serum Zn seviyesi ile tırnak duvarı ve tabanı Zn seviyesi arasında literatürden farklı olarak (Sadeghi ve ark., 2013) pozitif bir korelasyon saptandı. Aynı çalışmada, lezyonlu tırnağa sahip sığırların serum Cu seviyesi ile tırnak duvarı ve tabanı Cu seviyesi arasında negatif bir korelasyon olduğu ancak; bu korelasyonların zayıf ve istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi. Sağlıklı sığırlarda literatüre benzer olarak (Korkmaz ve ark., 2020) Fe ile Cu ve Zn düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu tespit edildi.

SONUÇ

Sonuç olarak; lezyonlu tırnağa sahip sığırlarda tırnak dokusu Mn, Fe ve Co düzeylerinin sağlıklı sığırlara göre daha yüksek olduğu, diğer taraftan tırnak lezyonu bulunan sığırlarda tırnak tabanı Cu ve Zn düzeyinin, sağlıklı sığır grubuna göre daha düşük olduğu gözlemlendi. Tırnak sağlığı açısından Mn, Cu ve Zn gibi iz elementlerin oldukça önemli olduğu, tırnak tabanı Cu ve Zn seviyesi düşük olan sığırlarda tırnak lezyonu oranının arttığı söylenebilir.

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

Yazarların Katkı Oranı: ¹BK:% 60, ²MK: % 40

Etik izin: ¹Bu çalışmaya AKU HADYЕК 25.12.2019 tarih ve 179 sayılı izni ile başlanmıştır.

² Bu yazıda sunulan veri, bilgi ve belgeler akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde edilmiştir.

Finansal destek: Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20.SAĞ.BİL.03 proje numarası ile desteklenmiştir.

Açıklama: Bu çalışma, aynı başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup XVII. Ulusal ve III. Uluslararası Veteriner Cerrahi Kongresinde (2022) özet bildiri olarak sunulmuştur.

KAYNAKLAR

- Akhtar, M. S., Farooq, A. A., Mushtaq, M. (2009).** Serum concentrations of copper, iron, zinc and selenium in cyclic and anoestrus Nili-Ravi buffaloes kept under farm conditions. *Pakistan veterinary journal*, 29(1): 47-48.
- Akın, İ. (2008).** Süt Sığırlarında Bazı Tırnak Hastalıklarının İyileşme Sürecinde Kan Serum ve Tırnak Dokusu İz Element Düzeyleri ile Yeni Oluşan Tırnak Dokusunun Histolojik Kalitesi Arasındaki İlişki. Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Cerrahi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Bursa.
- Andrieu, S. (2008).** Is There a Role for Organic Trace Elements Supplements in Transition Cow Health?. *Vet. J.*, 176(1): 77-83.
- Assis, B. M., Vulcani, V. A. S., Silva, L. A. F., Dias, M., Pancotti, A., Lima, C. R. O., Rabelo, R. E. (2017).** Biochemical Composition of the Hoof Capsule of Buffaloes and Its Influence on Hoof Quality. *Arg. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 69(1): 57-64.
- Atasoy, N. (2003).** Erzurum Yöresinde Süt Sığırlarında Görülen Ayak Hastalıklarının İnsidansı ve Bunların Sağaltımı. *Vet. Fak. Derg.*, 14(1): 1-5.
- Baggott, D. G., Bunch, K. J., Gill, K. R. (1988).** Variations in Some Inorganic Components and Physical Properties of Claw Keratin Associated with Claw Disease in the British Friesian Cow. *Br. Vet. J.*, 144(6): 534-542.
- Ballantine, H. T., Socha, M. T., Tomlinson, D. A. D., Johnson, A. B., Fielding, A. S., Shearer, J. K., Van Amstel, S. R. (2002).** Effects of Feeding Complexed Zinc, Manganese, Copper, and Cobalt to Late Gestation and Lactating Dairy Cows on Claw Integrity, Reproduction, and Lactation Performance. *Prof. Anim. Sci.*, 18(3): 211-218.
- Belge, F., Bildik, A., Belge, A., Kiliçalp, D., Atasoy, N. (2004).** Possible Association Between Chronic Laminitis and Some Biochemical Parameters in Dairy Cattle. *Aust. Vet. J.*, 82: 556-557.
- Borderas, T. F., Pawluczuk, B., De Passillé, A. M., Rushen, J. (2004).** Claw Hardness of Dairy Cows: Relationship to Water Content and Claw Lesions. *J. Dairy Sci.*, 87(7): 2085-2093.
- Canpolat, İ., Bulut, S. (2003).** Elazığ ve Çevresinde Sığırlarda Görülen Ayak Hastalıklarının İnsidansı Üzerine Gözlemler. *FÜ Sağ. Bil. Derg.*, 17: 155-160.
- Çeçen G., (2016).** Sığırlarda Topallık ve Ayak Hastalıkları. Medyay Kitabevi, Bursa, s: 1-178.
- Galbraith, H., Rae, M., Omand, T., Hendry, K. A. K., Knight, C. H., Wilde, C. J. (2006).** Effects of Supplementing Pregnant Heifers with Methionine or Melatonin on the Anatomy and Other Characteristics of Their Lateral Hind Claws. *Vet. Rec.*, 158(1): 21-25.
- Greene, L. W., Johnson, A. B., Paterson, J., Ansotegui, R. (1998).** Role of Trace Minerals in Cow Calf Cycle Examined. *Feedstuffs*, 70(27): 12-17.
- Griffiths, L. M., Loeffler, S. H., Socha, M. T., Tomlinson, D. J., Johnson, A. B. (2007).** Effects of Supplementing Complexed Zinc, Manganese, Copper and Cobalt on Lactation and Reproductive Performance of Intensively Grazed Lactating Dairy Cattle on the South Island of New Zealand. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 137(1-2): 69-83.
- Jelinski, M., Waldner, C., Penner, G. (2018).** Case-Control Study of Mineral Concentrations of Hoof Horn Tissue Derived from Feedlot Cattle with Toe Tip Necrosis Syndrome (Toe Necrosis). *Can. Vet. J.*, 59(3): 254.
- Karkoodi, K., Chamani, M., Beheshti, M., Mirghaffari, S. S., Azarfar, A. (2012).** Effect of Organic Zinc, Manganese, Copper, and Selenium Chelates on Colostrum Production and Reproductive and Lameness Indices in Adequately Supplemented Holstein Cows. *Biol. Trace Elem. Res.*, 146(1): 42-46.
- Kılıç, N., Ceylan, A., Serin, I., Gökbulut, C. (2007).** Possible Interaction Between Lameness, Fertility, Some Minerals, and Vitamin E in Dairy Cows. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 51(3): 425.
- Kibar, M., Leblebici, Z., Caglayan, T., Aksoy, A. (2016).** Is Level of Trace Minerals Important for Healthy Hoof in Dairy Cows?. *Manas J. Agr. Vet. Life Sci.*, 6(2): 14-21.
- Korkmaz, M., Sarıtaş, Z. K., Demirkan, İ., Görücü, F. (2020).** Comparing Trace Element Concentrations in Serum and Claw Tissue Samples of Buffaloes and Brown Swiss Cattle. *Atatürk Üni. Vet. Fak. Derg.* Baskıda.
- Langova, L., Novotna, I., Nemcova, P., Machacek, M., Havlicek, Z., Zemanova, M., Chrast, V. (2020).** Impact of Nutrients on the Hoof Health in Cattle. *Anim.*, 10(10): 1824.
- Lean, I.J., Westwood, C. T., Golder, H. M., Vermunt, J. J. (2013).** Impact of Nutrition on Lameness and Claw Health in Cattle. *Livest. Sci.*, 156(1-3): 71-87.
- Nouri, M., Ashrafi-Helan, J. (2013).** Observations on Healing Process of Wall Ulcers with Concurrent Digital Dermatitis in 52 Cattle: Gross and Light Microscopic Pathology. *Anim. Vet. Sci.*, 1(6): 60-65.
- Sadeghi, N. A., Zolhavarieh, S. M., Aliarabi, H., Dadmehr, B., Bahari, A., Zamani, P., Abolghazi, F. (2013).** Assessment of the Serum Zinc, Copper, β -Carotene and Vitamin A and Hoof Zinc and Copper Status in Different Locomotion Scores of Dairy Cattle. *Iran. J. Vet. Res.*, 14(4): 272-282.
- Seyrek, K., Yaylak, E., Akşit, H. (2008).** Serum Sialic Acid, Malondialdehyde, Retinol, Zinc, and Copper Concentrations. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 52: 281-284.
- Shakespeare, A. S. (2009).** Inadequate Thickness of the Weight-Bearing Surface of Claws in Ruminants. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 80(4): 247-253.

- Shearer, J. K., Plummer, P. J., Schleining, J. A. (2015).** Perspectives on the Treatment of Claw Lesions in Cattle. *Vet. Med.: Res. Rep.*, 6: 273.
- Shearer, J. K., Van Amstel, S. R., Gonzalez, A. (2005).** Manual of Foot Care in Cattle. Hoard's Dairyman Books, USA, s: 1-19.
- Siciliano-Jones, J. L., Socha, M. T., Tomlinson, D. J., Defrain, J. M. (2008).** Effect of Trace Mineral Source on Lactation Performance, Claw Integrity, and Fertility of Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.*, 91(5): 1985-1995.
- Sun, D., Li, C., Gu, C., Chen, J., Qu, Y., Wang, X., Guo, D. (2015).** Analysis of Mineral Elements, Metabolism, and Inflammation Indexes in the Plasma of Dairy Cows Suffering from Different Degrees of Lameness. *Biol. Trace Elem. Res.*, 168(2): 372-379.
- Vermunt, J. J., Greenough, P. R. (1995).** Structural characteristics of the Bovine Claw: Horn Growth and Wear, Horn Hardness and Claw Conformation. *Br. Vet. J.*, 151(2): 157-180.
- Yayla, S., Aksoy, Ö., Kılıç, E., Cihan, M., Özyayın, İ., Ermutlu, C. Ş. (2012).** Kars ve Yöresinde Sığırların Bakım ve Barındırma Koşulları ile Ayak Hastalıkları Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi. *Harran Üniv. Vet. Fak. Derg.*, 1(1): 22-27.
- Zhao, X. J., Li, Z. P., Wang, J. H., Xing, X. M., Wang, Z. Y., Wang, L., Wang, Z. H. (2015).** Effects of Chelated Zn/Cu/Mn on Redox Status, Immune Responses and Hoof Health in Lactating Holstein Cows. *J. Vet. Sci.*, 16(4): 439-446.

Evaluation of Effectiveness of the Containing Energized Oxygen Molecules Herbal Product on the Wound Healing

Nurullah OKUMUŞ¹, Sevim Feyza ERDOĞMUŞ^{2*}, Özlem ERDAL ALTINTAŞ³, Hasan Hüseyin DEMİREL⁴, Sefa ÇELİK⁵

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Afyonkarabırsar University of Health Sciences, Afyonkarabırsar, Türkiye

²Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, Afyonkarabırsar Health Sciences University, Afyonkarabırsar, Türkiye

³Department of Medical Services and Techniques Science, Şubat Vocational School of Health Services, Afyonkarabırsar University of Health Sciences, Afyonkarabırsar, Türkiye

⁴Department of Laborant and Veterinary Health, Bayat Vocational School, Afyon Kocatepe University, Afyonkarabırsar, Türkiye

⁵Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Afyonkarabırsar University of Health Sciences, Afyonkarabırsar, Türkiye

ABSTRACT

In recent years, the interest in herbal medicinal products has been increasing with the development of advanced formulation technologies related to the use of the medicinal and aromatic plants. These developed products are used to treat wounds and burns quickly and effectively. In this study, the effectiveness of containing energized oxygen molecules herbal product on wound healing was evaluated by in vitro and in vivo studies for the first time. Within the scope of the study, the biological activities of *Hypericum perforatum* L. medicinal oil, energized oxygen molecules base were determined. Results of this study showed that the base containing energized oxygen molecules and the medicinal oil of *Hypericum perforatum* L. had antimicrobial activity on pathogen test microorganisms and did not have a toxic effect on human dermal fibroblast cells. It has been determined that the herbal product containing energized oxygen molecule is effective in second degree deep burns. It is thought that the wound-healing effect of the product is realized thanks to its antimicrobial, antifungal, antioxidant and cell proliferation-increasing effect. In line with future clinical studies, the product has the potential to be used in the treatment of second-degree burns.

Keywords: Energized oxygen molecules *Hypericum perforatum* L., Wound healing

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Bitkisel İçerikli Ürünün Yara İyileşmesi Üzerindeki Etkinliğinin Değerlendirilmesi

ÖZ

Son yıllarda, tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımıyla ilgili ileri formülasyon teknolojilerinin gelişmesi ile birlikte bitkisel içerikli medikal ürünlere olan ilgi giderek artmaktadır. Geliştirilen bu ürünler, yara ve yanıkların tedavisini hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirebilmektedir. Bu çalışmada, ilk kez enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bitkisel içerikli ürünün yara iyileşme üzerindeki etkinliği in vitro ve in vivo çalışmalar ile değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, *Hypericum perforatum* L. tıbbi yağı ve enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bazın biyolojik etkinliği belirlenmiştir. Bu çalışma sonuçları, enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın ve *Hypericum perforatum* L. tıbbi yağının patojen test mikroorganizmaları üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin bulunduğunu ve insan dermal fibroblast hücreleri üzerinde toksik bir etkisinin bulunmadığını göstermiştir. Enerjilendirilmiş oksijen molekülü içeren bitkisel içerikli ürünün ikinci derece derin yanıklarda etkili olduğu belirlenmiştir. Ürünün yara iyileştirici etkinliğinin antimikrobiyal, antifungal, antioksidan ve hücre proliferasyonunu artırıcı etkisi sayesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. İleride yapılacak klinik çalışmalar doğrultusunda ürün ikinci derece yanıkların tedavisinde kullanılabilme potansiyeline sahiptir.

Anahtar Kelimeler: Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri, *Hypericum perforatum* L., Yara iyileşme

To cite this article: Okumuş N, Erdoğan S.F, Erdal Altıntaş Ö, Demirel H.H, Çelik S. Evaluation of Effectiveness of the Containing Energized Oxygen Molecules Herbal Product on the Wound Healing. Kocatepe Vet J. (2023);16(2):195-208

Submission: 03.02.2023 Accepted: 25.05.2023 Published Online: 08.06.2023

ORCID ID: NO: 0000-0001-6082-0818, SFE: 0000-0002-4319-7558, ÖEA: 0000-0003-4680-1738, HHD: 0000-0002-4795-2266, SÇ: 0000-0002-5187-378X

*Corresponding author e-mail: fevza.erdogmus@afsu.edu.tr

GİRİŞ

Deri, organizmanın canlılığını sürdürebilmesi için gerekli birçok fonksiyonu yerine getirmektedir. Deri bütünlüğünün ve işleyişinin çeşitli faktörler ile bozulmasına yara adı verilmektedir. Bu işleyişin yeniden sağlanması ve doku bütünlüğünün yeniden kazanılması ise yara iyileşmesi olarak tanımlanmaktadır. Hemostasis, inflamasyon, proliferasyon ve maturasyon evrelerinden oluşan yara iyileşme sürecinde çeşitli biyokimyasal ve hücrel süreçler ile hücrel yapılar ve doku tabakaları yeniden oluşturulmaktadır. Yanık yaraları; derinlik, alan genişliği ve yanığa neden olan etmenlere göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. En yaygın sınıflandırma ise yanığın deri katmanlarında oluşturduğu hasar değerlendirilerek yapılan derinlik sınıflandırmasıdır. Derinliklerine göre yanıklar; birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü derece yanıklar olmak üzere dört ayrı grupta incelenmektedir (Markiewicz-Gospodarek ve ark. 2022; Noor ve ark. 2022). Birinci derece yanıklar; derinin epidermis tabakası adı verilen en üst katmanının etkilendiği yanıklardır. Bu nedenle yanık alanı kırmızı, kuru ve ağrılıdır. Genellikle birkaç gün içinde yara izi bırakmayacak şekilde iyileşebilir ve yaralanmadan sonraki birkaç gün içinde epitelyumda kabuklaşma görülmektedir (O'Brien ve Billmire 2008). İkinci derece yanıklarda ise, derinin dermis ve epidermis tabakası etkilenmektedir. Bu tip yanıklar; genellikle sıcak su ile haşlanma, alev veya sıcak cisim ile temas sonucunda oluşmaktadır. İkinci derece yanıklar; doku hasarının daha fazla olduğu ağrılı ve iltihaplanmaya açık yanıklardır (Hussain 2013). Üçüncü derece yanıklarda ise epidermis, dermis ve hipodermisten oluşan derinin tüm katmanları etkilenmektedir ve bu yanıkların kendi kendine iyileşebilme özelliği yoktur. Yanık alanının rengi pembe-kırmızıdan kahverengi ve beyazımsı, sarımsı renge döner ve ağrı duyusu kaybolmuştur. Üçüncü derece yanıklarda cerrahi tedavi uygulanmadığında skar gelişimi, sepsis, mortalite riski artmaktadır. Dermal ve epidermal yapılar canlılığını yitirdiği için yara kenarından tekrar epitelize olarak iyileşme sürecine geçebilir. Dördüncü derece yanıklar; kas, tendon ve kemiklerin etkilendiği oldukça derin yanıklardır. Bu tip yanıklar mutlaka cerrahi uygulama gerektirmektedir, defektlerin kapatılması veya bazı olgular için amputasyon işlemi gerekli olabilmektedir (Patel ve ark. 2008; Suha ve Sanam 2022).

Yara iyileşme sürecinde ideal ortam koşullarının sağlanması oldukça önemlidir. Doku rejenerasyonunda kullanılan ürünler arasında yer alan yara-yanık kremleri; çözünürlükleri, etkili etken madde salımları, yara-yanık bölgesine kolayca uygulanabilir olmaları gibi avantajlara sahip oldukları için yaygın olarak kullanılır. Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri çok güçlü dezenfektan özellikleri ile ortamın mikrobiyolojik dengesinin sağlanmasında oldukça önemlidir. Kararsız bileşikler olup, belirli bir yarılanma süresi sonunda enerjilerini yitirip tekrar nötr

oksijen moleküllerine dönüşürler. Serbest radikal olmadıkları için ozon olarak bilinen triozon moleküllerinden ayrılırlar. Güneş ışınları veya 254 nm dalga boyu ışınları oksijen moleküllerini enerjilendirilmiş oksijen türevlerine dönüştürürler. Oksijen molekülleri, bu enerji sayesinde birbirleri arasında geçici bağlar oluşturularak enerji depolar. Profoks jeneratörü, radyoaktif olmayan plazma üreterek havadaki oksijeni tıpkı güneş gibi enerjilendirebilir. Sistem verimi %95'in üzerindedir, bu sayede manyetik sürtünme en az seviyede olur ve yüksek ısı açığa çıkmaz. Böylece, az miktarda elektrik enerjisi harcayarak havadan elde ettiği oksijeni enerjilendirilmiş oksijen moleküllerine dönüştürebilir (Tecer ve Gündüz 2021). Enerjilendirilmiş oksijen moleküllerinin yağ içerisinde tutunma oranı fazla olup, çeşitli krem formülasyonlarında baz olarak kullanılabilir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan, *Hypericum perforatum* L. halk arasında yanık ve yaraların iyileşmesini hızlandırmak için yaygın olarak kullanılır (Altan ve ark. 2015; Nobakht ve ark. 2022). Türkiye'de ve Avrupa'da yayılış gösteren *H. perforatum* L., Hypericaceae (Guttiferae) familyasında yer alır. *H. perforatum* L. halk arasında "sarı kantaron, binbirdelik otu" olarak adlandırılır, çok yıllık, sarı çiçekli bir bitkidir. *H. perforatum* L. içerdiği hypericin, hyperforin, quercetin, rutin, campferol, myricetin ve hyperoside gibi biyoaktif bileşenler sayesinde, yara ve yanık tedavisi başta olmak üzere, sarılık, sıtma, tüberküloz, diyabet ve çeşitli enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır (Çelen ve ark. 2008, Saddique ve ark. 2010, Adams ve Graves 2013, Eroğlu ve ark. 2019; Erdal-Alıntaş ve Erdoğan 2023). Süntar ve arkadaşları; *H. perforatum* L.'un antienflamatuar etki gösterdiğini, enfeksiyona direnci ve fibroblast göçünü arttırdığını kolajen birikimi sağladığını rapor etmiştir (Süntar ve ark. 2010). *H. perforatum* L.'un yara iyileştirici aktivitesinin, fibroblastik aktivite ve kolajen sentezindeki artıştan kaynaklandığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Öztürk ve ark. 2007; Yalcınkaya ve ark. 2022; Parin ve Deveci 2023).

Bu çalışma kapsamında, *H. perforatum* L. tıbbi yağı ve enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın biyolojik aktiviteleri belirlenmiştir. Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baza *H. perforatum* tıbbi yağı eklenerek hazırlanan ürünün yanık yarası iyileştirme etkinliği ilk kez in vitro ve in vivo çalışmalar ile değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bitki Materyali ve Bitki Örneklerinin Hazırlanması

H. perforatum L. bitkisi 2021 yılının haziran-temmuz aylarında, Afyonkarahisar, Merkez, Erkmen beldesi, bölgesinden toplanmış ve teşhis edilmiştir (Herbaryum Kayıt No: AKU-10964). Bitkinin toprak

üstü kısımları gölgede kurutularak, ince toz halinde öğütülmüş ve steril siyah cam kavanozların içerisinde oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir. Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 50 g *H. perforatum* bitkisinin toprak üstü kısımları 500 ml zeytinyağı (Kristal Natural Sızma Zeytinyağı-Kristal Ticaret ve Sanayi Kontuvarı A.Ş) içeren koyu renkli, steril cam kavanoza yerleştirilmiş ve kavanoz 4 hafta boyunca günde 12 saat güneş ışığında tutularak tıbbi yağ elde edilmiştir (Suntar ve ark. 2010).

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Baz Elde Edilmesi

Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri (EOM) içeren baz, Profoks cihazı kullanılarak elde edilmiştir (Tecer ve Gündüz 2021). Bu jeneratör, saf oksijeni enerjilendirilmiş oksijen moleküllerine dönüştürebilmektedir. Bu oluşumunun gerçekleştiği reaktörlerde 254 nm dalga boyunda şiddetli UV radyasyonu elektron sintilatörleri aracılığı ile oluşturulur. Nano delikler içeren bu sintilatörlerden geçen elektronlar 254 nm dalga boyunda plazmik ışımaya neden olur. Kapasitör yapıdaki bu reaktör bir bobin tarafından belli bir rezonans frekansında indüklenerek LC rezonans devresinde elektronların nano tüplerden geçebilmesi için reaktörler AC 50.000 volt potansiyelde indüklenir. Bu sistemler aracılığı ile üretilen tetra oksijen, zeytinyağı gibi birçok bitkisel yağa emdirilme potansiyeli sahiptir. Bu çalışmada, enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baz oluşturulması için zeytinyağı kullanılmıştır.

Antimikrobiyal Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Test Mikroorganizmaları

Antimikrobiyal aktivite belirlenmesinde, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonunda mevcut olan; *L. monocytogenes* ATCC 19115, *S. aureus* ATCC 25923, *K. pneumoniae* NRRLB 4420, *P. aeruginosa* ATCC 11778, *E. faecalis* ATCC 51289, *E. coli* ATCC 35218, *B. subtilis* NRS 744, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 12600, *C. albicans* ATCC 10231 test mikroorganizmaları kullanılmıştır.

In Vitro Sitotoksikite Çalışmaları

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren bazın insan deri fibroblast (HDFa) hücre hattı (ATCC, PCS-201-012) üzerindeki sitotoksik etkisi MTT yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Hücreler nemli ortamda, %5 CO₂ inkübatöründe 37 °C'de çoğaltılmıştır. Besiyeri olarak içerisinde %10 (v/v) oranında ısı ile inaktive edilmiş fetal buzağı serumu (FBS; Fetal bovine serum), %1 (v/v) oranında penisilin streptomisin ve %1 (v/v) oranında (1 mM) glutamin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyeri kullanılmıştır. Absorbans değerleri doğrudan canlı hücre sayısı ile orantılıdır. MTT analizleri 96 kuyucuklu pleytler kullanılarak yapılmıştır. Her bir

kuyucuğa 200 µl medium içerisinde 2×10⁴ sayıda hücre ekilerek 37 °C'de inkübe edilmiştir. En az %70 konfluent olan tıbbi yağ ve EOM içeren baz eklenerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT çözeltisi (5 mg.ml⁻¹, PBS içerisinde) eklenerek 37 °C'de 2-4 saat inkübe edildikten sonra hücrelerden MTT boyası uzaklaştırılarak her bir kuyucuğa 200 µl DMSO eklenmiş ve 5 dakika inkübe edilmiştir. Renk değişimi, ELISA plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okutularak belirlenmiştir. Kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır (Denizot ve Land 1986).

% Hücre canlılığı = (örneğin absorbans değeri/kontrolün absorbans değeri)*100

Antimikrobiyal Etkinliğin Belirlenmesi

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren bazın antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için patojen test mikroorganizmaları kullanılmıştır. Antimikrobiyal aktivite tayini için minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır (CLSI 2016). Tüm çalışmalar üç tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

Tıbbi yağ ve enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren bazın MİK değerlerini belirleyebilmek için, test mikroorganizmaları 37 °C'de, 24 saat süreyle inkübe edildikten sonra mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland bulanıklık derecesine getirilmiş ve 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarına her bir test mikroorganizmasından 100 µl (10⁵-10⁶ kob.ml⁻¹) eklenmiştir. Daha sonra tıbbi yağ ve EOM içeren baz yarı yarıya seyreltilerek her bir konsantrasyondan 100 µl kuyucuklara ilave edilmiş ve 37 °C'de, 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonrasında bakteriyel büyüme, her bir bileşiğin büyüme inhibisyonunun MİK değerini belirlemek için ELISA cihazında ölçüm yapılarak belirlenmiştir (CLSI 2002, CLSI 2006).

Disk difüzyon testi için, patojen test mikroorganizmaları Müeller Hinton Broth (MHB) besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra mikroorganizmalar 0.5 Mc Farland bulanıklık derecesine getirilmiştir. Mc Farland bulanıklığına getirilen kültürden 0.1 ml alınarak Müeller Hinton Agar (MHA) katı besiyerine yayma ekim yapılarak, test edilecek tıbbi yağ ve EOM içeren baz konsantrasyonları boş steril disklere (6 mm) emdirildikten sonra petrilere yerleştirilmiştir. Daha sonra petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra oluşan inhibisyon zon çapları ölçülerek kontrol grubuna göre değerlendirilme yapılmıştır. Pozitif kontrol grubu olarak geniş spektrumlu antibiyotikler olan penisilin (10 mg.ml⁻¹), amikasin (30 mg.ml⁻¹) ve flukonazol (10 mg.ml⁻¹) kullanılmıştır.

Oksidan-Antioksidan Aktivitesi ve Toplam Fenolik İçerik Belirlenmesi

H. perforatum L. tıbbi yağın oksidan, antioksidan aktivitesini belirleyebilmek için TAS/TOS kiti kullanılmıştır. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eq.l}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Erel 2005). Antioksidan aktivite sonuçları $\text{mmol Trolox Eq.l}^{-1}$ olarak ifade edilmiştir (Erel 2004). Toplam fenol miktarı Folin-Ciocaltaeu yöntemine (Gamez 1999) göre yapılmıştır. 150 μl örnek, 150 μl Folin Ciocaltaeu reaktifi (%50) ve 3 ml sodyum karbonat çözeltisi (%2) deney tüpüne karıştırılarak 30 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre sonunda çözeltilerin absorpsanları UV-Vis spektrofotometresi'nde 760 nm'de okunarak toplam fenol miktarları; gallik asit ile çizilen kalibrasyon eğrisinden, mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplanmıştır.

Enerjilendirilmiş Oksijen Molekülleri İçeren Bitkisel İçerikli Ürün Hazırlanması

İlk olarak profoks jeneratörü kullanılarak EOM içeren krem bazı elde edilmiştir. Bu krem bazına yara iyileştirme özelliği kazandırmak amacıyla *H. perforatum* L. tıbbi yağı eklenmiştir. En uygun formülasyon (F₂) ise ürün değerlendirme çalışmalarında kullanılmıştır.

F₁:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (1:1 v/v)
F₂:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (2:1 v/v)
F₃:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (3:1 v/v)
F₄:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (4:1 v/v)
F₅:EOM içeren baz+ *H. perforatum* L. tıbbi yağı (5:1 v/v)

İn Vitro Biyouyumluluk Değerlendirilmesi

EOM içeren bitkisel içerikli ürünün HDFa hücre hattı üzerinde biyouyumluluğunun belirlenmesi için ürünlerin ekstraktları kullanılmıştır. Ekstraksiyon için örnekler bir saat UV ışığında sterilize edildikten sonra içerisinde DMEM besiyeri bulunan 24 kuyucuklu plakalara eklenmiş ve hücreler eklenmeden önce bir gece boyunca 37 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra her bir kuyucuğa $0,2 \times 10^6$ hücre eklenerek 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda 24, 48 ve 72 saat süre boyunca inkübe edilmiştir. Belirlenen süreler tamamlandığında kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 μl taze DMEM besiyeri ile 50 μl MTT çözeltisi eklenmiştir. Hücre kültür plakaları karanlık ortamda 4 saat süreyle inkübe edilmiştir (37 °C'de, %5 CO₂). Bu süre sonunda kuyucuklardaki besiyeri uzaklaştırılarak, her kuyucuğa 100 μl DMSO çözeltisi eklenmiştir. Ardından plakalar 30 dakika süreyle karanlık bir ortamda bekletilmiş ve çözeltiler pipetaj sonrası yeni plakalara aktararak ELISA Microplate Reader yardımıyla 570 nm dalga boyunda absorpsan değerleri ölçülerek % hücre canlılığı belirlenmiştir. İçerisinde sadece besiyeri bulunan kuyucuklar kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Demirci ve ark. 2020).

İn Vivo Çalışmalar

In vivo çalışmada 250-300 g ağırlığında Wistar albino türü erkek sıçanlar kullanılmıştır. Sıçanlar deney hayvanları ünitesindeki kafeslerinde; 24 ± 1 °C sıcaklıkta, 12 saat ışık/karanlık ve düzenli havalandırılan ortamda bulundurulmuştur. Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda sıçanlar üzerinde ikinci derece yanık oluşturularak *in vivo* çalışmalar yapılmıştır. İkinci derece yanık oluşturmak amacıyla; 12 saat aç bırakılmış deneklere 87 mg.kg^{-1} ketamin ve 13 mg.kg^{-1} ksilazin kullanılarak anestezi uygulanıp deneklerin vücut yüzey alanlarının %10'unu geçmeyecek şekilde $1 \times 1 \text{ cm}^2$ 2 adet metal plak 30 saniye kaynar suda bekletildikten sonra deneklerin tıraş edilmiş sırtlarına 10 saniye basılı tutulmuştur. Böylece her denegin sırt bölgesinde $1 \times 1 \text{ cm}^2$ karşılıklı iki yanık bölgesi oluşturulmuştur. Bu çalışmada; 48 adet erkek sıçan kullanılarak her biri rastgele seçilmiş 12 sıçandan oluşan 4 grup oluşturulmuştur. Birinci grup, negatif kontrol (NK) grubu olarak kullanılmış olup bu gruptaki sıçanlara herhangi bir teröpatik ajan uygulanmamıştır. İkinci grup; pozitif kontrol (PK) grubuna, ticari olarak satılan yara iyileştirme etkinliği bilinen *Centella asiatica* bitkisinin titredilmiş ekstresini içeren krem (Madecassol) uygulanmıştır. Üçüncü grup EOM içeren baz ve dördüncü grup ise EOM içeren bitkisel içerikli ürün olacak şekilde uygulanmıştır. Her gruptan yanık oluşumu sonrası 0., 3., 7., 14., 21. ve 28. günlerde 3'er sıçan örnekleme için anestezi altına alınıp her yara bölgesi en geniş yara kısmını içine alacak şekilde biyopsi yapıldıktan sonra nötral buffer formalin ile fikse edilerek sıçanlar anestezi altında dekapitasyon şekliyle ötenazi edilmiştir. Alınan örneklerin histopatolojik incelemeler için hazırlanması, yaraların reepitelizasyon, granülasyon dokusu, kolajen birikimi, inflamatuvar hücre varlığı, anjiyogenezis ve ülser kriterleri bakımından histolojik yara iyileşmesinin değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir. Histopatolojik değerlendirmeler için alınan deri örnekleri %10'luk tamponlanmış formalinde 1 hafta süre ile fikse edilmiştir. Deri dokusu örnekleri akan çeşme suyunda bir gece yıkama işlemini takiben, artan derecelerdeki etanol serilerinden (%50-%100) ve ksilen serilerinden geçirildikten sonra 58 °C'de erimiş parafin infiltrasyonunu takiben parafin bloklara gömülmüştür. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) ile 5-7 μm kalınlığındaki kesitler lamlar üzerine alındıktan sonra bu kesitler hematoksilin-eosin boyama yöntemiyle boyanıp yara iyileşme skalasına göre değerlendirilmiştir. Boyanmış olan kesitler, araştırma mikroskopunda (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) incelenerek fotoğraflanmıştır. İstatistiksel Analizler Çalışma sonucunda elde edilen veriler varyans analiz testleri SPSS 22.0 versiyonu (SPSS Software, IBM, ABD) kullanılarak One Way ANOVA testi ile değerlendirilmiştir.

BULGULAR

H. perforatum L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazı HDFa hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72 saat boyunca sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. *H. perforatum* L. tıbbi yağının konsantrasyon artışına bağlı olarak 24. ve 48. saatlerde hücre canlılığı değerlerinde artış göstermiştir. En yüksek hücre canlılığı 24. saatte 1/1 konsantrasyonda (seyreltilmemiş tıbbi yağ) %129,09 olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Yanık kremi formülasyonunda krem bazı olarak kullanılan EOM içeren krem bazının HDFa hücreleri üzerinde 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılığı değerlerinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre canlılığı değerleri de artış göstermiştir. 72. saatte ise 1/4'ten düşük konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre düşük olup 1/4'ün üzerindeki konsantrasyonlarda hücre canlılığı kontrol grubuna göre yüksek değerler göstermiştir. 72. saatte genel olarak hücre canlılığı sonuçları tüm konsantrasyonlarda 24 ve 48. saate göre azalmıştır. En yüksek hücre canlılığı ise 24. saatte 1/1 konsantrasyonda %134,00 olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Tüm veriler, Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., USA) programında One Way ANOVA, Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel analizleri yapılmıştır. $p \leq 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

H. perforatum L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazı antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi için MİK ve disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Patojen test mikroorganizmalarına karşı MİK değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Patojen test mikroorganizmaları üzerindeki inhibisyon etkileri Tablo 2'de gösterilmiştir. Konsantrasyon artışına bağlı olarak antimikrobiyal etkinlikte de artış görülmüştür. Tıbbi yağ saf olarak uygulandığında antimikrobiyal etkinliğin olduğu fakat seyreltme yapıldıkça bu etkinin azalarak kaybolduğu belirlenmiştir. EOM içeren baz saf olarak uygulandığında daha yüksek değerlerde antimikrobiyal etkinlik belirlenmiştir. Özellikle, *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 25923 ve *C. albicans* ATCC 10231 üzerinde pozitif kontrol kadar etkili olduğu saptanmıştır.

Tıbbi yağın TAS, TOS ve OSİ değerleri ve toplam fenolik içerik miktarı Tablo 3'te gösterilmiştir. Toplam fenol miktarı için gallik asit ile hazırlanan standart grafik kullanılarak belirlenmiştir. ($R^2=0,994$). Biyolojik aktivite belirleme çalışmalarından elde edilen veriler doğrultusunda EOM içeren baz ve iyileştirme etkinliğini artırmak amacıyla *H. perforatum* L. tıbbi yağ kullanılarak farklı formüller (F_1, F_2, F_3, F_4, F_5) hazırlanmıştır. F_4 ve F_5 numaralı formüller in vitro ve in vivo çalışmalar için uygun görülmediği için in vitro çalışmalarda F_1, F_2, F_3 formülasyonları kullanılmıştır. Bu formülasyonların HDFa hücreleri üzerinde biyoyumlulukları 24, 48 ve 72 saat periyotlarında test edilmiştir. Test edilen formülasyonların 24 saat

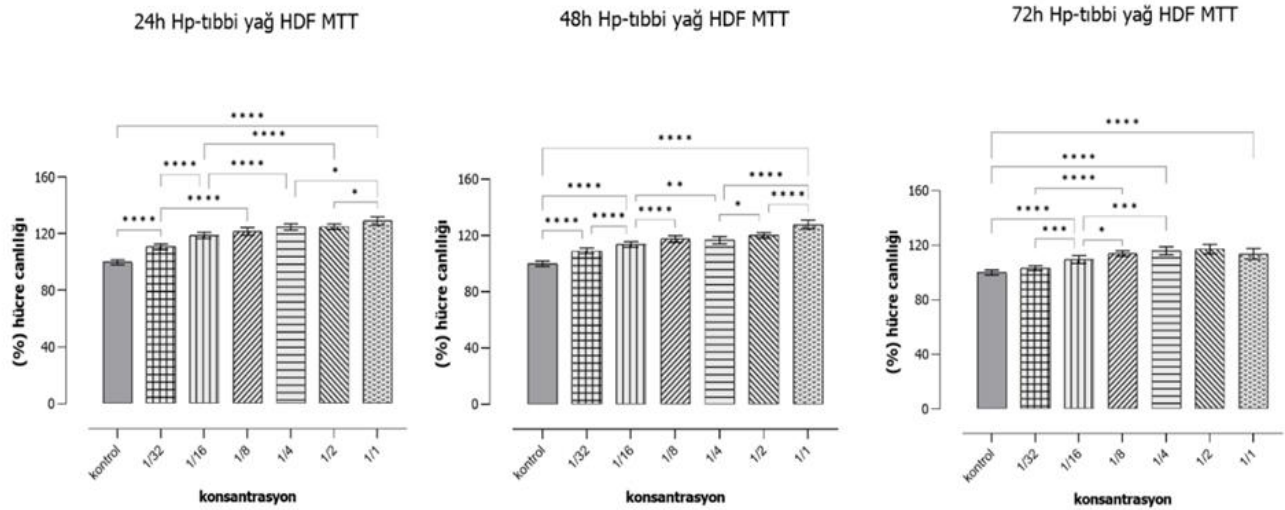
periyodunda kontrol grubuna göre hücre canlılığının yüksek olduğu saptanmıştır. En yüksek biyoyumluluk, F_2 formülasyonunda saptanmıştır (Şekil 3). Bu nedenle in vivo çalışmalarda ürün olarak F_2 formülasyonu kullanılmıştır. Elde edilen veriler Graph Pad Prism 9 (GraphPad Software, Inc., USA) programında One Way ANOVA, Tukey's çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ($p \leq 0.05$).

İn vivo çalışma gruplarının ImageJ programı kullanılarak ölçülen yanık alanlarının iyileşme yüzdeleri Tablo 4 ve Şekil 4'te gösterilmiştir. Araştırmadan elde edilen sonuçlar, SPSS 22.0 istatistik paket programında One Way ANOVA testi uygulanarak yapılmıştır. İstatistiksel fark bulunan sonuçlara Duncan testi uygulanmış, veriler "ortalama \pm standart sapma" olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık için $p \leq 0.05$ kabul edilmiştir (Tablo 4). İn vivo çalışma gruplarında kullanılan deney hayvanlarının ağırlıklarında gruplar arasında ve zamana bağlı olarak herhangi bir istatistiksel farklılık belirlenmemiştir.

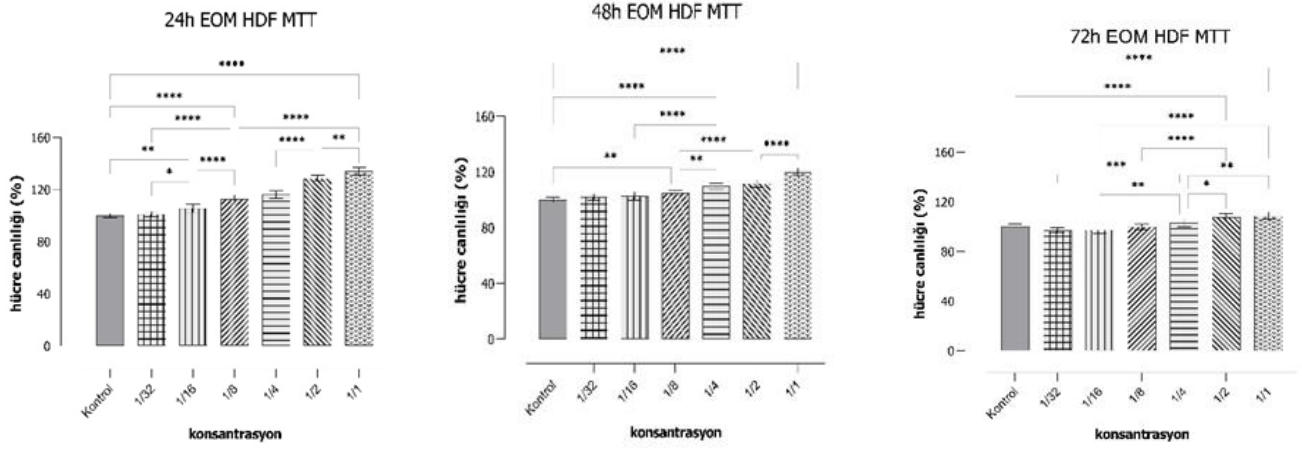
Yapılan histopatolojik incelemede hemotoksilen-eozin ile boyanan preparatlarda iyileşme sürecini takip etmek için inflamasyon, damarlanma ve fibroblastik aktivite 0., 3., 7., 14., 21. ve 28 günlerde alınan biyopsiler ile değerlendirilmiştir (Şekil 5, Tablo 5). Her bir parametre için kontrol ve tedavi grupları karşılaştırılmıştır. Birinci gün alınan biyopsilerde yanık derinliği değerlendirilmiş ve ikinci derece derin yanık oluşturulduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda, reepitelizasyon değerlendirmesinde yapılan histopatolojik inceleme sonucu 3 ve 7. günler arasında ürün ve PK gruplarında orta düzeyde epitel oluşumu gözlenirken EOM içeren baz grubunda hafif ve NK grubunda yok denecek kadar az oranda belirlenmiştir. 14., 21. ve 28. günlerde ise ürün ve PK gruplarında yüksek düzeyde reepitelizasyon görülmüştür. Epitel hücrelerin keratinosit migrasyonu ile temelini sağladığı, hasarlı alanda yeniden bir bazal laminanın kurulması reepitelizasyon ile oluşturulur, maturasyon fazıyla da sağlamlaştırılır (Broughton 2006, Sgvamang ve ark. 2007, Velnar ve ark. 2009, Leong ve ark. 2017). Dolayısıyla yara iyileşmesinin en önemli bileşenlerinden biri olan reepitelizasyonun, kaliteli bir yara iyileşmesi elde edilebilmesi için yüksek oranda olması gerekir. Neovaskülarizasyon düzeyi incelendiğinde ürün ve PK gruplarında 7. günden itibaren yükseldiği belirlenmiştir. Skar ve ulkus düzeylerine bakıldığında 3. günde ürün grubunda %80 yüksek düzeyde iken, % 20 orta düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. PK grubunda da %90 hafif oranda skar ve ulkus oluşumu ile karşılaşılmıştır. 7. gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; skar ve ulkus oranları ürün grubunda %80 hafif düzeyde iken %20 orta düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. PK grubunun tamamında hafif düzeyde skar ve ulkus oluşumu ile karşılaşılmıştır. 14.

gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; ürün grubunun %80'inde hafif, %20'sinde ise orta düzeyde gerçekleşirken; bu oran PK grubunda %90 hafif düzeyde skar ve ulkus oluşumu görülmüştür. 21. ve 28. gündeki skar ve ulkus düzeyleri karşılaştırıldığında; ürün ve PK grubunda skar ve ulkusa rastlanmamıştır. Kolajen aktivite değerlendirmesine göre 3. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında ürün grubunda %40 yüksek düzeyde, %10 hafif ve %50 orta düzeyde kolajen oluşumu gözlenirken bu oran PK grubunda %50'sinde yüksek, %40'ında orta ve %10'unda ise hafif düzeyde gerçekleşmiştir. 7. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında ürün grubu preparatlarının %80'inde yüksek; %10'unda orta ve %10'unda ise hafif düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda bu oran %90 yüksek düzeyde ve %10 ise hafif düzeyde saptanmıştır. 14. gündeki kolajen düzeyi karşılaştırıldığında; ürün grubu preparatlarının

%80'inde yüksek; %10'unda orta ise orta düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda bu oran %90 yüksek düzeyde ve %10 orta düzeyde saptanmıştır. Benzer şekilde EOM içeren baz grubunda bu oran yarı yarıya orta ve hafif düzeyde gerçekleşmiştir. NK grubunda ise bu oranlar %80 hafif düzey kolajen ve %20 orta düzeyde kolajen oluşumu gerçekleşmiştir. 21.gündeki kolajen düzeyi incelendiğinde; oranlar ürün grubunda %80 yüksek düzey, %10 orta ve %10 hafif düzey kolajen oluşumu görülürken; PK grubunda, %50 yüksek düzeyde, %40 orta ve %10 hafif düzeyde kolajen oluşumu ile karşılaşmıştır. 28. gün preparatları incelendiğinde oranlar ürün grubunun %80 inde yüksek düzeyde iken %10'unda orta ve %10'unda ise hafif düzeyde kolajen oluşumu görülmüştür. PK grubunda %80 yüksek düzey kolajen ve %20 orta düzey kolajen oluşumu görülmüştür. Yara iyileşmelerinde oluşan yeni dokunun dayanıklılığı kolajenizasyona bağlıdır.



Şekil 1: *H. perforatum* L. tıbbi yağının HDFa hücre canlılığı üzerindeki etkisi
Figure 1: Effect of *H. perforatum* L. medicinal oil on HDFa cell viability



Şekil 2: EOM içeren bazın HDFa hücre canlılığı üzerindeki etkisi
Figure 2: Effect of EOM containing base on HDFa cell viability

Tablo 1. *H. perforatum* L. tıbbi yağının ve EOM içeren bazın MİK değerleri
Table 1. MIC values of *H. perforatum* L. medicinal oil and base containing EOM

Test Mikroorganizmaları	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK)	
	Tıbbi Yağ	EOM içeren baz
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	1:2	1:4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1:4	1:8
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	1:8
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	1:2	1:4
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	1:2	1:8
<i>E. coli</i> ATCC 35218	1:2	1:4
<i>B. subtilis</i> NRS 744	1:2	1:4
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	1:4	1:8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1:2	1:4
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1:2	1:8
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	1:4	1:8
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1:2	1:8

Tablo 2. Disk difüzyon test sonuçları
Table 2. The results of disc diffusion test

TEST MİKROORGANİZMALARI	İnhibisyon Zon Çapları (mm±ss)													
	Tıbbi Yağ					EOM içeren baz					PK ₁	PK ₂	PK ₃	NK
	Saf	1:1	1:2	1:4	1:8	Saf	1:1	1:2	1:4	1:8				
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19115	11±0,5	10±0,3	9±0,5	8±0,5	-	12±0,3	11±0,0	10±0,1	9±0,0	8±0,0	24±0,5	15±0,4	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	11±0,3	10±0,3	9±0,3	8±0,3	-	24±0,5	18±0,5	16±0,5	15±0,5	13±0,4	30±0,8	13±0,3	-	-
<i>K. pneumoniae</i> NRRLB 4420	-	-	-	-	-	11±0,3	10±0,2	10±0,1	9±0,2	8±0,5	30±1,2	15±0,5	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 11778	12±0,3	10±0,5	9±0,5	8±0,3	8±0,5	14±0,5	13±0,4	11±0,2	10±0,4	9±0,2	29±0,7	14±0,2	-	-
<i>E. faecalis</i> ATCC 51289	10±0,4	9±0,3	8±0,5	8±0,5	-	12±0,6	11±0,3	10±0,4	9±0,5	8±0,5	25±0,5	15±0,2	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218	10±0,5	9±0,3	9±0,5	8±0,3	-	11±0,5	10±0,5	9±0,5	8±0,0	-	30±0,7	12±0,5	-	-
<i>B. subtilis</i> NRS 744	11±0,2	10±0,3	9±0,3	8±0,5	-	11±0,4	10±0,3	9±0,5	8±0,0	-	30±0,8	20±0,3	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	11±0,2	10±0,5	9±0,3	9±0,5	8±0,0	21±0,5	19±0,7	18±0,5	16±0,7	14±0,5	31±0,5	17±0,5	-	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922	10±0,5	9±0,5	8±0,5	7±0,3	-	11±0,3	10±0,5	9±0,0	8±0,0	-	29±0,5	16±0,5	-	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	11±0,3	10±0,0	9±0,0	9±0,0	8±0,0	15±0,5	13±0,2	12±0,0	10±0,2	9±0,2	20±0,5	15±0,3	-	-
<i>S. aureus</i> ATCC 12600	12±0,0	11±0,0	10±0,5	9±0,5	8±0,5	22±0,5	20±0,8	17±0,3	16±0,5	14±0,4	39±1,0	15±0,5	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	10±0,0	9±0,0	8±0,0	-	-	22±0,5	20±0,5	19±1,0	17±0,7	16±0,5	30±0,5	-	18±0,5	-

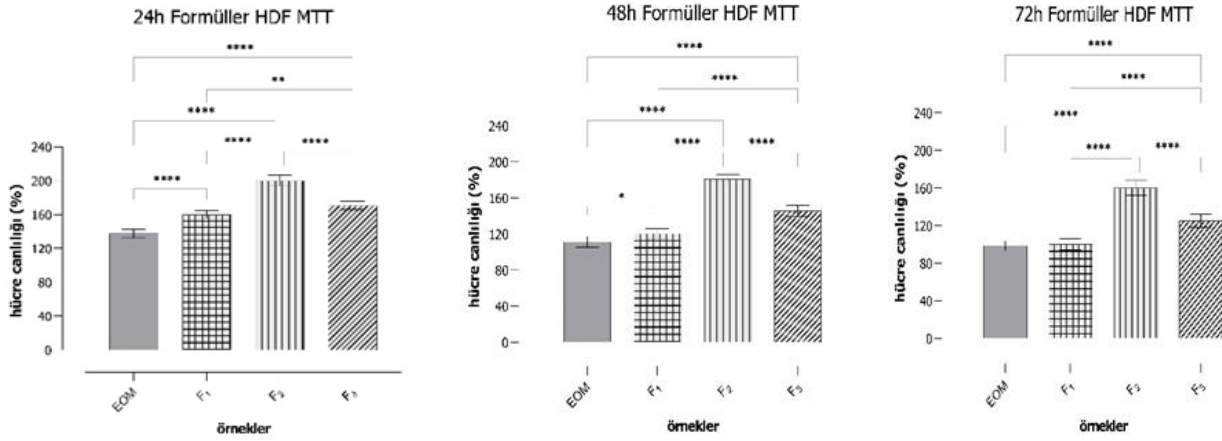
**C. albicans* ATCC 10231 için; PK₃: Flukonazol (10 mg.ml⁻¹) ss: standart sapma

*Diğer test mikroorganizmaları için; PK₁: Penicilin G (10 mg.ml⁻¹) PK₂: Amikasin (30 mg.ml⁻¹) NK: dH₂O

Tablo 3. *H. perforatum* L. tıbbi yağının TAS, TOS, OSI ve total fenolik içerik miktarları
Table 3. TAS, TOS, OSI and total phenolic content values of *H. perforatum* L. medicinal oil

Örnekler	Toplam Antioksidan Düzeyi (TAS) mmol Trolox.l ⁻¹	Toplam Oksidan Düzeyi (TOS) µmol H ₂ O ₂ .l ⁻¹	Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	Toplam Fenolik İçerik (mg GAE*.g ⁻¹ ekstrakt)
Tıbbi Yağ	2,797±0,016	6,303±0,013	2,253±0,025	0,314±0,006

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=5)



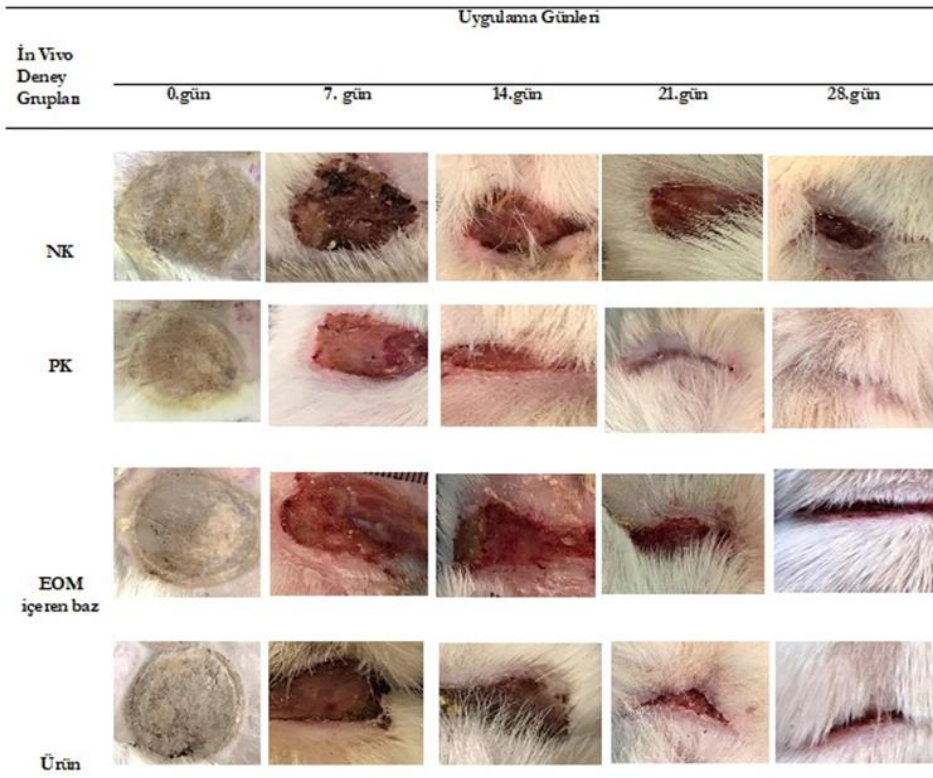
Şekil 3: EOM, F₁, F₂ ve F₃ formülasyonlarının in vitro biyouyumluluk sonuçları
Figure 3: In vitro biocompatibility results of product formulations

Tablo 4. İn vivo deney gruplarının ImageJ programı kullanılarak ölçülen yanık alanlarının ortalama iyileşme yüzdeleri

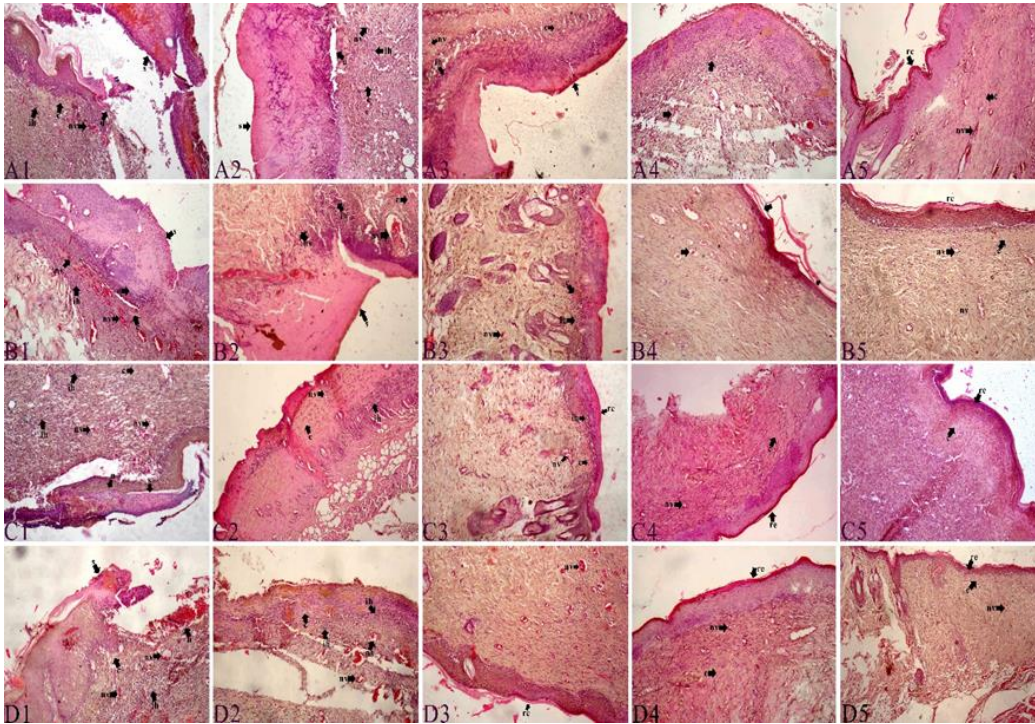
Table 4. The average healing percentages of the burn areas measured using the image j program of the in vivo experimental groups.

İn vivo grupları (n=10)	% İyileşme			
	7. gün	14. gün	21.gün	28. gün
NK	18,73±3,85 ^c	29,45±4,58 ^d	50,99±4,39 ^c	71,65±5,33 ^c
PK	31,38±5,43 ^a	64,91±4,86 ^a	86,19±4,21 ^a	98,57±2,51 ^a
EOM içeren baz	27,46±3,34 ^b	48,25±2,96 ^c	71,71±2,90 ^b	93,85±2,02 ^b
Ürün (F2)	29,23±2,12 ^{ab}	59,92±5,08 ^b	83,04±4,19 ^a	92,69±3,11 ^b
“p” Değerleri	0,001	0,001	0,001	0,001

NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif Kontrol, EOM içeren baz: Enerjilendirilmiş oksijen molekülleri içeren baz
 Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur.



Şekil 4: In vivo deney gruplarının farklı uygulama günlerindeki yanık alanlarının görüntüleri.
Figure 4: Images of burn areas in vivo experimental groups on different application days.



A: Negatif kontrol **1:** 3.gün **s:**Skar
B: Pozitif kontrol **2:** 7. gün **nv:** Neovaskularizasyon
C: EOM içeren baz **3:** 14. Gün **ih:** inflamatuvar hücre
D: Ürün (F₂) **4:** 21. Gün **c:** kolajen
5: 28. gün **re:**Reepitelizasyon **u:**Ulkus

Şekil 5: In vivo çalışma gruplarının farklı günlerdeki histopatolojik incelemeleri
Figure 5: Histopathological examinations of in vivo groups on different days

Tablo 5. İkinci derece yanık modelinin reepitelizasyon, inflammatuar hücre, neovaskülarizasyon ve kolajen düzeyleri üzerine etkileri

Table 5. Effects of second degree burn model on reepithelialization, inflammatory cell, neovascularization and collagen levels

İn vivo çalışma grupları	Reepitelizasyon	Neovaskülarizasyon	Skar ve Ulkus	Kolajen	İnflammatuar Hücre
NK-3.gün	0,16±0,40 ^c	0,50±0,44 ^b	2,33±0,51 ^{ab}	1,01±0,16 ^g	2,83±0,41 ^a
PK-3.gün	0,51±0,54 ^{de}	0,83±0,40 ^b	1,83±0,75 ^{bcd}	2,33±0,81 ^{abcd}	2,33±0,51 ^{abcd}
EOM-3.gün	0,51±0,54 ^{de}	0,66±0,51 ^b	2,00±0,38 ^{bc}	1,66±0,52 ^{cdefg}	2,66±0,51 ^{ab}
Ürün-3.gün	0,66±0,51 ^{de}	0,83±0,40 ^b	2,66±0,51 ^a	2,16±0,75 ^{abcde}	2,50±0,54 ^{abc}
NK-7.gün	0,51±0,63 ^{df}	0,66±0,51 ^b	1,83±0,40 ^{bcd}	1,16±0,40 ^{fg}	2,66±0,52 ^{ab}
PK-7.gün	1,33±0,51 ^{bcd}	2,33±0,81 ^a	1,01±0,12 ^{fg}	2,33±1,03 ^{abcd}	2,33±0,51 ^{abcd}
EOM-7.gün	1,01±0,63 ^{cde}	1,01±0,96 ^b	1,51±0,54 ^{cdef}	2,01±1,09 ^{abcdef}	2,66±0,51 ^{ab}
Ürün-7.gün	0,83±0,40 ^{cde}	2,16±1,32 ^a	1,33±0,51 ^{defg}	2,51±0,84 ^{abc}	2,33±0,51 ^{abcd}
NK-14.gün	1,16±0,47 ^{cde}	2,16±0,98 ^a	1,66±0,51 ^{cde}	1,33±0,51 ^{efg}	2,51±0,55 ^{abc}
PK-14.gün	2,66±0,51 ^a	3,01±1,32 ^a	0,83±0,40 ^g	2,83±0,41 ^b	1,83±0,41 ^{cde}
EOM-14.gün	2,16±1,32 ^{ab}	2,66±0,51 ^a	1,50±0,54 ^{cdef}	1,66±0,51 ^{cdef}	2,00±0,66 ^{bcde}
Ürün-14.gün	2,50±0,83 ^a	2,66±0,51 ^a	1,16±0,40 ^{efg}	2,66±0,52 ^{ab}	1,83±0,41 ^{cde}
NK-21.gün	1,01±0,90 ^{cde}	2,50±0,83 ^a	0,33±0,81 ^h	1,50±0,54 ^{defg}	2,51±0,54 ^{abc}
PK-21.gün	2,66±0,81 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,33±0,81 ^{abcd}	1,33±0,51 ^{ef}
EOM-21.gün	1,84±1,02 ^{abc}	2,66±0,51 ^a	0,16±0,04 ^h	1,66±0,51 ^{cdefg}	1,66±0,51 ^{de}
Ürün-21.gün	2,50±0,83 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,51±0,83 ^{abc}	1,33±0,52 ^{ef}
NK-28.gün	2,33±0,81 ^a	2,66±0,51 ^a	0,00±0,00 ^h	1,66±0,51 ^{cdefg}	1,51±0,54 ^{ef}
PK-28.gün	2,83±0,40 ^a	2,83±0,41 ^a	0,00±0,00 ^h	2,66±0,52 ^{ab}	0,51±0,54 ^{gh}
EOM-28.gün	2,66±0,51 ^a	2,66±0,50 ^a	0,00±0,00 ^h	1,83±0,40 ^{bcdefg}	1,00±0,89 ^{fg}
Ürün-28.gün	2,83±0,41 ^a	2,83±0,40 ^a	0,00±0,00 ^h	2,50±0,82 ^{abc}	0,33±0,52 ^h
P değeri	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

Veriler ortalama ± standart sapma şeklinde sunulmuştur (n=5).

TARTIŞMA

Günümüzde yara ve yanıkların tedavisinde yan etkilere ve istenmeyen durumlara sebebiyet veren kimyasal içerikli ürünler yerine bitkisel içerikli doğal ürünler tercih edilmektedir (Hajialyani ve ark. 2018). Son yıllarda tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanımıyla ilgili bilgi ve deneyimin artması, ileri formülasyon teknolojisinin gelişmesi ile birlikte doğal içerikli medikal ürünler geliştirilmektedir. Geliştirilen bu ürünler ile yara/yanık tedavileri hızlı ve etkili bir şekilde gerçekleştirilmektedir. Medikal yararlı ürün eldesinde kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler sahip oldukları antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar, analjezik ve antitrombosit etkileri ile yara ve yanıkların tedavisinde doku rejenerasyonu etkinliğini arttırmaktadır. Bu çalışma kapsamında, tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan *H. perforatum* L. tıbbi yağının biyolojik aktivitesi ortaya çıkarılarak geliştirilen üründe yara iyileştirme ajanı olarak kullanılmıştır. Ayrıca hızlı bir iyileştirme etkisi bulunan antimikrobiyal-antioksidan özelliğe sahip EOM içeren baz ürün formülasyonunda kullanılmıştır.

EOM içeren baz ve *H. perforatum* L. tıbbi yağ seyreltilmeden uygulandığında antimikrobiyal etkinliğin olduğu fakat seyreltme yapıldıkça bu etkinin azalarak kaybolduğu belirlenmiştir. Tıbbi yağ ve EOM içeren bazın yara/yanık bölgelerinde kolonize olabilen patojen mikroorganizmalar üzerinde etkili olması geliştirilen yanık kreminin yara iyileştirme etkinliğinin artırılması bakımından oldukça önemlidir. Bu bitkinin yara iyileştirme etkisinin antimikrobiyal, antioksidan ve antiinflamatuvar aktivitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Saddique ve ark. 2010). Orhan ve Kartal (2015), sarı kantaronda klorojenik asit, rutin, hiperozit, kersitrin, quersetin ve biapigenin, psödohiperisin, hiperisin, hiperforin ve adhiperforin bileşiklerini belirlemişlerdir. Başka bir çalışmada; Burunkaya ve ark. (2021) yapmış oldukları çalışmada sarı kantaron bitkisinde; klorojenik asit, flavanol, fenolik asit, naphthodianthronlar, flavonoidler tanımlanmışlardır. Çalışmamızda, *H. perforatum* L. tıbbi yağının toplam antioksidan düzeyi $2,797 \pm 0,016$, toplam oksidan düzeyi $6,303 \pm 0,013$ ve oksidatif stres indeksi ise $2,253 \pm 0,025$ olarak belirlenmiştir. Erdal Altıntaş ve Erdoğan (2023) tarafından yapılan bir çalışmada ise *H. perforatum* bitkisinin etanol ve metanol ekstraktlarının toplam antioksidan düzeyleri sırasıyla $22,352 \pm 0,002$; $18,804 \pm 0,15$, toplam oksidan düzeyleri sırasıyla $4,743 \pm 0,001$; $4,523 \pm 0,12$ ve oksidatif stres indeksleri ise 0,21; 0,24 olarak belirlenmiştir.

H. perforatum L. tıbbi yağ ve EOM içeren baz ile ürün formülasyonları hazırlanarak in vitro biyoyumluluk çalışmaları yapılmıştır. Geliştirilen formüller arasından

% canlılık üzerinde en fazla etkiye sahip olan formül F₂ numaralı olarak belirlenmiştir. Bu formülün yara iyileştirme etkinliğini belirleyebilmek için Wistar albino türü erkek sıçanlar üzerinde ikinci derece yanık modeli oluşturularak in vivo çalışmalar yapılmıştır. İmage j uygulamasında yapılan değerlendirmeler sonucunda, 7. günün sonunda ürün grubunda %29,23 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %18,73 ve negatif kontrol grubunda ise %31,38 olarak saptanmıştır. 14. günün sonunda ürün grubunda %59,92 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %64,91 ve negatif kontrol grubunda ise %29,45 olarak saptanmıştır. 21. günün sonunda ürün grubunda %83,04 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %86,19 ve negatif kontrol grubunda ise %50,99 olarak saptanmıştır. 28. günün sonunda ürün grubunda %92,69 iyileşme belirlenmişken bu oran pozitif kontrol grubunda %18,73 ve negatif kontrol grubunda ise %31,38 olarak saptanmıştır. Gruplar arasında istatistiksel açıdan farklılık olduğu, 21. günde ürünün ve pozitif kontrol arasında farklılık olmadığı belirlenmiştir. % İyileşme oranları karşılaştırıldığında geliştirilen ürünün pozitif kontrole yakın değerler gösterdiği saptanmıştır. İn vitro ve in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen verilere göre EOM içeren bazın % hücre canlılığı ve % yara iyileşme üzerinde olumlu yönde etkisinin olduğu ve bu etkinliğin formül içeriğinde kullanılan tıbbi yağ ile daha çok artış gösterdiği belirlenmiştir.

Yara iyileşme süreci; inflamasyon, proliferasyon, rejenerasyon ve hücresel yanıtın yer aldığı karmaşık bir süreçtir. Yara iyileşme sürecinde, keratinositler, fibroblastlar, endotelial hücreler, makrofajlar ve plateletlerin rol oynar. Süntar ve ark. (2010) *H. perforatum*'un antiinflamatuvar etki gösterdiğini, fibroblast göçünü arttırarak kolajen birikimi sağladığını rapor etmişlerdir. *H. perforatum*'un yara iyileştirici aktivitesinin, fibroblastik aktivite ve kolajen sentezindeki artıştan kaynaklandığını rapor eden çalışmalar da mevcuttur (Öztürk ve ark. 2007). Literatür çalışmaları, *H. perforatum* L. özütlerinin antimikrobiyal etkisinin bulunduğunu, yara ve yanıkların tedavisinde kullanılabilirliğini ortaya çıkarmıştır (Keleş ve ark. 2001, Tolkunova ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmada, *H. perforatum* L. özütü içeren merhem yanık iyileşme süresini kısalttığına ve antiseptik etkinlik gösterdiği belirtilmiştir (Saddique ve ark. 2010). Başka bir çalışmada, *H. perforatum* L'den elde edilen zeytinyağı özütünün in vivo yara iyileşme etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar; *H. perforatum* zeytinyağı özütünün eksizyon (%5,1-82,6 inhibisyon) ve sirküler insizyon (%20,2- 100,0 inhibisyon) üzerinde önemli bir yara-iyileştirici etkiye sahip olduğunu göstermiştir (Duman ve ark. 2017). Başka bir çalışmada ise Kıyan ve ark. (2015), deneysel

haşlama tipi yanıklarda *H. perforatum* L. (sarı kantaron) tedavisinin akut etkilerini gümüş sülfadiazin tedavisiyle karşılaştırılmıştır. *H. perforatum* grubunun epidermis kalınlığının ve damar sayısının diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve yanık yara iyileşmesinde gümüş sülfadiazine göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Öztürk ve ark. (2007), *H. perforatum*'un etanol özütünün yara iyileştirici etkisini tavuk embriyonik fibroblast kültüründe dekspatenol ve *Centella asiatica*'nın titre edilmiş ekstraktı ile karşılaştırılmıştır. *H. perforatum*'un yara iyileştirici mekanizmasının kolajen artışı ve fibroblast migrasyon artışı bakımından *C. asiatica*'nın etki mekanizmasına benzer olduğu saptanmıştır. Süntar ve ark. (2010) ise *H. perforatum*'un aktif bileşenlerinin epitelizasyon üzerinde etkisinin olduğunu fakat fibroblast proliferasyonunu veya yeni damar oluşumunu etkilemediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada EOM içeren bazın tek başına ikinci derece derin yanıklar üzerinde negatif kontrole göre daha etkili bulunmuştur. *H. perforatum* L. tıbbi yağı eklenerek elde edilen ürün ise ikinci derece derin yanıklar üzerinde pozitif kontrole yakın derecelerde iyileştirme etkinliği göstermiştir.

SONUÇ

Günümüzde gereksiz ve yanlış ilaç kullanımı, özellikle antibiyotiklere karşı gelişen direnç, yan etki ve deri florasının bozulması yara/yanık tedavilerinde yeni seçeneklerin arayışına neden olmuştur. Bitkisel içerikli ilaçların ucuz ve kolay bulunabilirliği, yan etkilerinin olmaması veya az olması sentetik ilaçlara alternatif olması bakımından önemlidir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler; *H. perforatum* L.'nin tıbbi kullanımı, ilaç geliştirme çalışmalarından kullanılabilme potansiyeli ve ülkemize sağlayabileceği ekonomik katkı bakımından önem arz etmektedir. Ayrıca, çalışma kapsamında ilk kez enerjilendirilmiş oksijen molekülleri kullanılarak bitkisel içerikli ürün geliştirilerek doku rejenerasyonundaki etkinliği in vitro ve in vivo etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; ikinci derece derin yanıklarda geliştirilen ürünün pozitif kontrole yakın derecede etkili olduğu saptanmıştır. Bu etkinin antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan etkisi sayesinde yara iyileşmesini desteklediği yönünde veriler elde edilmiştir. Bu durum, yara/yanık iyileşmesinde kullanılan *Rosmarinus officinalis*, *Plantago major*, *Acahypha langiana*, *Aloe vera* ve *Centella asiatica* gibi tıbbi bitkilerin, reepitelizasyon ve kolajenizasyonu hızlandırıcı maddelerle birlikte kullanımının yanık tedavisine önemli bir katkı sunacağını göstermektedir. Yanık iyileşmesinin evrelerinin belirgin bulgularına göre sağaltımın evrelerinin süreleri takip edilerek, iyileşmede dokunun ihtiyaç duyacağı ajanlarla desteklenmesinin en sağlıklı

doku iyileşmesini sağlayacağı düşünülmektedir. Bu çalışma kapsamında elde edilen verilerin, ürünün ticarileştirilmesi için yapılması planlanan klinik araştırmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Finansal destek: Bu çalışma, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, 19. TEMATİK.002 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Etik izin: Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.08.2019 tarih ve 49533702\99 nolu kararı ile onaylanmıştır.

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

Yazarların Katkı Oranı: NO:%30, SFE:%25, ÖEA:%20, HHD: %15, SÇ:%10

KAYNAKLAR

- Solomon, D., Adams, J., & Graves, N. (2013). Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. *Journal of affective disorders*, 148(2-3), 228-234.
- Burunkaya, B., Selli, S., & Kelebek, H. (2021). Sarı Kantaron (*Hypericum perforatum* L.) Fenoliklerinin Karakterizasyonu, Antioksidan ve Antimikrobiyal Potansiyelinin Belirlenmesi. *Çukurova tarım ve gıda bilimleri dergisi*, 36(2), 309-324.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2002. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. 2nd ed. Document M27-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 7th ed. Document M7-A7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2016. Performance standards for antimicrobial standards institute susceptibility testing, 26 th Edition. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory.
- Çelen, G., Özkan, S., & Ayhan, F. (2008). The phenolic compounds from *Hypericum perforatum* and their antimicrobial activities. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 36(4), 339-345.
- Demirci, T., Hasköylü, M. E., Eroğlu, M. S., Hemberger, J., & Öner, E. T. (2020). Levan-based hydrogels for controlled release of Amphotericin B for dermal local antifungal therapy of Candidiasis. *European journal of pharmaceutical sciences*, 145, 105255.
- Denizot, F., & Lang, R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of immunological methods*, 89(2), 271-277.
- Duman, R., Dogan, H.H., & Tuncer, P. (2017). Evaluation of the in vitro antiviral activity of *Salvia halophila* and *Salvia sclarea* extracts against human respiratory syncytial virus (HRSV). *International journal of science and research*, 3 (7), 44-59.

- Erdal Altıntaş, Ö., & Erdoğan, S. F. (2023). Development of controlled delivery systems by nanoliposomes of *Hypericum perforatum* L. extracts. *International Journal of Plant Based Pharmaceuticals*, 3(1), 86–94. <https://doi.org/10.29228/ijpbp.20>
- Erel, O. (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry*, 38(12), 1103-1111.
- Erel, O. (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical biochemistry*, 37(2), 112-119.
- Gamez-Meza, N., Noriega-Rodriguez, J. A., Medina-Juarez, L. A., Ortega-Garcia, J., Cazarez-Casanova, R., & Angulo-Guerrero, O. (1999). Antioxidant activity in soybean oil of extracts from *Thompson grape bagasse*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1445-1447.
- Hussain A. (2013). Surgical treatment of acute burns. *Wounds*, 9(4), 54-59.
- Hajialyani, M., Tewari, D., Sobarzo-Sánchez, E., Nabavi, S. M., Farzaei, M. H., & Abdollahi, M. (2018). Natural product-based nanomedicines for wound healing purposes: therapeutic targets and drug delivery systems. *International journal of nanomedicine*, 13, 5023.
- Keleş, O., Ak, S., Bakirel, T., & Alpınar, K. (2001). Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. *Turkish journal of veterinary and animal sciences*, 25(4), 559-565.
- Kıyan, S., Uyanıkgil, Y., Altuncı, Y. A., Cavusoglu, T., Cetin Uyanıkgil, E. O., & Karabey, F. (2015). Investigation of acute effects of *Hypericum perforatum* (St. John's Wort-Kantaron) treatment in experimental thermal burns and comparison with silver sulfadiazine treatment. *Ulus travma acil cerrahi dergisi*, 21 (5), 323-336.
- Markiewicz-Gospodarek, A., Koziół, M., Tobiasz, M., Baj, J., Radzikowska-Büchner, E., & Przekora, A. (2022). Burn Wound Healing: Clinical Complications, Medical Care, Treatment, and Dressing Types: The Current State of Knowledge for Clinical Practice. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19, 1338.
- Nobakht, S.Z., Akaberi, M., Mohammadpour, A.H., Moghadam, A.T., & Emami, S.A. (2022). *Hypericum perforatum*: Traditional uses, clinical trials, and drug interactions. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 25(9), 1045-1058.
- Noor, A., Afzal, A., Masood, R., Khaliq, Z., Ahmad, S., Ahmad, F., Qadir, M.B., & Irfan, M. (2022). Dressings for burn wound: a review. *Journal of Material Science*, 57, 6536–6572
- O'Brien, S. P., & Billmire, D. A. (2008). Prevention and management of outpatient pediatric burns. *Journal of craniofacial surgery*, 19(4), 1034-1039.
- Orhan, I. E. (2015). LC-DAD-MS-Assisted quantification of marker compounds in *Hypericum perforatum* L.(St. John's wort) and its antioxidant activity. *Turkish journal of pharmaceutical sciences*, 12(3).
- Özkan, E.E., Çelik, B.Ö., & Afife, M. (2019). Antimicrobial activities of five endemic *Hypericum* species from Anatolia compared with *Hypericum perforatum*. *Journal of Research Pharmacology*, 23, 114-119. Öztürk, N., Korkmaz, S., & Öztürk, Y. (2007). Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 33-39.
- Parin, F.N., & Deveci, S. (2023). Production and Characterization of Bio-based Sponges Reinforced with *Hypericum perforatum* oil (St. John's Wort Oil) via Pickering Emulsions for Wound Healing Applications. *ChemistrySelect*, 8(5), e202203692.
- Patel, P.P., Vasquez, S.A., Granick, M.S., & Rhee, S. T. (2008). Topical antimicrobials in pediatric burn wound management. *Journal of craniofacial surgery*, 19(4), 913-922.
- Raja, K.S., Garcia, M. S., & Isseroff, R.R. (2007). Wound re-epithelialization: modulating keratinocyte migration in wound healing. *Frontiers in bioscience-landmark*, 12(8), 2849-2868.
- Saddiq, Z., Naeem, I., & Maimoona, A. (2010). A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 131(3), 511-521.
- Suha, S.A., & Sanam, T.F. (2022). A deep convolutional neural network-based approach for detecting burn severity from skin burn images. *Machine Learning with Applications*, 9, 100371. <https://doi.org/10.1016/j.mlwa.2022.100371>.
- Süntar, I.P., Akkol, E.K., Yilmazer, D., Baykal, T., Kırmızıbekmez, H., Alper, M., & Yeşilada, E. (2010). Investigations on the in vivo wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. *Journal of ethnopharmacology*, 127(2), 468-477.
- Tecer LH., & Gündüz AM. (2021). Design of a new cold atmospheric plasma reactor based on dielectric barrier discharge for the treatment and recovery of textile dyeing wastewater: Profoks/CAP Reactor. *Sustainable practices in the textile industry*, 285-305. <https://doi.org/10.1002/9781119818915.ch12>
- Tolkunova, N.N., Cheuva, E.N., & Bidyuk, A.Y. (2002). Effect of medicinal plant extracts on microorganism development. *Pishchevaya promyshlennost*, 8, 70-71.
- Townsend, C.M., Beauchamp, R.D., Evers, B.M., & Mattox, K.L. (2016). Sabiston textbook of surgery. Elsevier Health Sciences.
- Velnar, T., Bailey, T., & Smrkolj, V. (2009). The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *Journal of international medical research*, 37(5), 1528-1542.
- Yalcinkaya, E., Basaran, M.M., Tunckasik, M.E., Yazici, G.N., Elmas, Ç., & Kocaturk, S. (2022). Efficiency of hypericum perforatum, povidone iodine, tincture benzoin and tretinoin on wound healing, *Food and Chemical Toxicology*, 166, 113209, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113209>.

Investigation and Epidemiology of Agents Isolated from the Lungs of Cattle, Sheep, and Goats with Pneumonia in the Marmara Region Using Bacteriological Methods

Zeynep KÜÇÜK BAYKAN¹, Mehmet Hakan TABAK¹, Aslı KILIÇ¹, Hale GÜN¹, Alper METE²

¹Pendik Veterinary Control Institute, İstanbul, Türkiye

²Equine Hospital, İstanbul, Türkiye

ABSTRACT

The aim of this study is to identify the bacteria encountered in the lungs of cattle, sheep, and goats with pneumonia and to statistically evaluate the distribution of the detected bacteria based on age, species, seasons, and provinces to generate updated epidemiological data. The rates of bacteria isolated from 152 lung samples: *Streptococcus* spp. 37.5%, *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) 26.3%, *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) 11.8%, *Staphylococcus* spp. 9.2%, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) 5.3%, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) 5.3% and *Moraxella* spp. 4.6%. In this study, the bacteria isolated from animals less than one year old were: *Streptococcus* spp. 33.3%, *M. haemolytica* 25.5%, *P. multocida* 11.8%, *Staphylococcus* spp. 9.8%, *P. aeruginosa* 5.9%, *K. pneumoniae* 9.8%, and *Moraxella* spp. 3.9%. The older animals were: *Streptococcus* spp. 39.6%, *M. haemolytica* 26.7%, *P. multocida* 11.9%, *Staphylococcus* spp. 8.9%, *P. aeruginosa* 5.0%, *K. pneumoniae* 3.0%, and *Moraxella* spp. 5%. The provinces with the highest bacterial isolation rates were: Bursa 15.79%, Kocaeli 14.47%, and Kırklareli 13.16%. In conclusion, this study will contribute to the development of protection-control protocols against respiratory infections, management of herd health, and literature.

Keywords: Bacteria, Cattle, Goat, Lung, Pneumonia

Marmara Bölgesi'nde Pnömoni Görülen Sığır, Koyun ve Keçilerin Akciğerlerinden İzole Edilen Etkenlerin Bakteriyolojik Yöntemlerle Araştırılması ve Epidemiyolojisi

ÖZ

Bu çalışma ile pnömoni görülen sığır, koyun ve keçilerin akciğerlerinde tespit edilen bakterilerin, izole edildikleri hayvan türleri, yaşlarının yanı sıra izole edildiği bölge ve mevsime göre dağılımlarının istatistiksel olarak değerlendirilmesinin yanında güncel epidemiyolojik verilerin oluşturulması hedeflendi. Akciğer örneklerinden (152 adet) izole edilen bakteri oranları; *Streptococcus* spp. %37,5, *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) %26,3, *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) %11,8, *Staphylococcus* spp. %9,2, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) %5,3, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) %5,3, *Moraxella* spp. %4,6 olarak saptandı. Bir yaşından küçük hayvanların akciğerlerinden; *Streptococcus* spp. %33,3, *M. haemolytica* %25,5, *P. multocida* %11,8, *Staphylococcus* spp. %9,8, *P. aeruginosa* %5,9, *K. pneumoniae* %9,8, *Moraxella* spp. %3,9; 1 yaşından büyüklerde *Streptococcus* spp. %39,6, *M. haemolytica* %26,7, *P. multocida* %11,9, *Staphylococcus* spp. %8,9, *P. aeruginosa* %5, *K. pneumoniae* %3 ve *Moraxella* spp. %5 olarak saptandı. Çalışmada bakteri izolasyon oranlarının en yüksek olduğu iller; Bursa %15,79, Kocaeli %14,47 ve Kırklareli %13,16 olarak hesaplandı. Bu çalışmanın sonuçlarının solunum sistemi infeksiyonlarına karşı koruma-kontrol protokollerinin oluşturulmasına, sürü sağlığı yönetimine ve bilimsel literatürlere katkı sağlanacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akciğer, Bakteri, Keçi, Pnömoni, Sığır

To cite this article: Küçük Baykan Z, Tabak MH, Kılıç A, Gün H, Mete A. Investigation and Epidemiology of Agents Isolated from the Lungs of Cattle, Sheep, and Goats with Pneumonia in the Marmara Region Using Bacteriological Methods. (2023) 16(2):209-218

Submission: 23.11.2022

Accepted: 31.05.2023

Published Online: 13.06.2023

ORCID ID; ZKB: 0000-0002-6423-7985 MHT: 0000-0003-3941-7172 AK: 0000-0002-7135-0556 HG: 0000-0003-2681-0813 AM: 0000-0002-4810-5579

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

GİRİŞ

Solunum sistemi hastalıkları, büyükbaş ve küçükbaş hayvan yetiştiriciliğinde sıklıkla görülen ve ekonomik kayıplara neden olan hastalıkların önünde gelmekte olup, bu hastalıkların kontrolü ve yönetimi gün geçtikçe önem kazanmaktadır (Lorenz ve ark. 2011). Tarım ve Orman Bakanlığı 2022 yılı hayvancılık verilerine göre Türkiye’de 24.373.097 sığır, 60.651.594 koyun ve 15.473.298 keçi yetiştirilmektedir (Anonim 2022a). Çalışmadaki numunelerin orijini olan Marmara Bölgesi’nde; 4.975.439 küçükbaş ve 2.055.249 büyükbaş hayvan bulunmaktadır (Anonim 2022b).

Solunum sistemi infeksiyonlarının epidemiyolojik özelliklerinin yeterince bilinmemesi, hastalıkların kontrol altına alınması için gerekli önlemlerin oluşturulmasını güçleştirmektedir (Özen ve ark. 2009). Ruminant pnömonilerinin epidemiyolojik insidensini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda hastalık dağılımları; coğrafi şartlara, uygun olmayan barınaklardaki mevsimsel etkilere, beslenme yetersizliklerine, yataklık seçimine, havalandırmaya, yoğun ya da hatalı gruplandırmaya, hekimlik uygulamalarındaki başarıya, teşhis-tedavi-kontrol yetersizliklerine, hayvanların yaşına, cinsiyetine, ırkına, canlı ağırlıklarına ve bireysel dirençlerine göre farklılık göstermektedir (Snowder ve ark. 2006, Taylor ve ark. 2010, Güneş 2018, Küçük Baykan ve Özcan 2019a, Küçük Baykan ve Özcan 2019b).

Yapılan bir çalışmada, 0-6 ay yaş arasındaki 328 buzağının %25’inin hastalandığı, hastalanan buzağılarda %7,32 oranında en sık görülen ikinci hastalığın solunum sistemi ile ilgili olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada ölüm oranı %0,31, tedavi başarısı %95,83 gibi yüksek bir oranda verilmiştir (Küçük Baykan ve Özcan 2019a). Buzağuların anneleri olan 342 inekten solunum sistemi hastalığı nedeniyle kesime gönderilenlerin oranı ise %7,41 olarak saptanmıştır (Küçük Baykan ve Özcan 2019b).

Pnömonik akciğerlerden çeşitli mevsim ve yaşlarda izole edilen bakterilere dair yapılan çeşitli çalışmalarda sığır, koyun ve keçi akciğer örneklerinden izole edilen bakteri oranının *Streptococcus* spp. %0,87-%20, *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) %1,17-%80, *Pasteurella multocida* (*P. multocida*) %0,7-%32,2, *Staphylococcus* spp. %0,1-35%, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) %0,8-%40, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) %0,6-%52,8 ve *Moraxella* spp. %0,6-%21,9 arasında değiştiği görülmüştür (Özbey ve Muz 2004, Oruç 2006, Booker ve ark. 2008, Tijjani ve ark. 2012, Lima ve ark. 2016, Ugochukwu ve ark. 2017, Gülaydın ve Gürtürk 2018, Sen ve ark. 2018, Franco ve ark. 2019, Singh ve ark. 2020). Türkiye’deki çiftlik hayvanlarında solunum sistemi hastalıklarının mevsim ve yaş ile ilişkilendirildiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Gazioğlu ve ark. (2016) oğlaklarda *M. haemolytica* bakterisi üzerine yaptıkları çalışmada; küçük yaşlarda solunum ile seyreden hastalıkların sıklıkla septisemik formda izlendiğinden, solunum sistemi hastalığı belirtilerinin genellikle yaşlı hayvanlarda dikkat çekici olduğundan bahsedilmiştir. Bir yaşından büyük solunum sistemi hastalığı olan 115 sığırdan 76 adedi (%66,6) sonbahar-kış mevsiminde, 36 adedi (%31,3) ilkbahar-yaz mevsiminde ölmüştür. Aynı çalışmada sonbahar-kış döneminde solunum sistemi hastalığı diğer mevsimlere göre daha sık belirlenmiştir (Dorso ve ark. 2021).

Bu çalışmada; 2018-2021 yılları arasında Marmara Bölgesi’ndeki evcil sığır, koyun ve keçilerde görülen pnömoni olgularının bakteriyolojik yönden araştırarak sahada görülen güncel etiyolojik ajanların saptanması, saptanan ajanların yaş, tür, mevsim ve iller bazında dağılımının istatistiksel olarak değerlendirilerek ortaya konması amaçlandı.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Bu çalışmada Marmara Bölgesi, çevre il ve ilçelerde mevsimsel şartlara göre mera ve kapalı ağıl/ahır şartlarında bakımı yapılan, pnömoni nedeniyle öldüğü bildirilen ve sahada görevli veteriner hekimler tarafından 2018-2021 yılları arasında laboratuvarımıza gönderilen sığır, koyun ve keçilere ait akciğerler kullanıldı. Yaş, gönderim ili/ilçesi, sevk zamanı ve anamnez gibi kayıtları eksiksiz olan hayvanlar ile bakteriyolojik numune gönderim kuralları gerekliliğini sağlayan örnekler değerlendirmeye alındı (Anonim 2022c). Toplamda incelenen 152 akciğer örneğinin 45'i (%29,60) sığırlara, 25'i (%16,45) keçilere, 82'si (%53,95) koyunlara aitti. Numunelerin geldiği il, mevsim, yaş ve hayvan türüne ait bilgiler Tablo 1' de verildi.

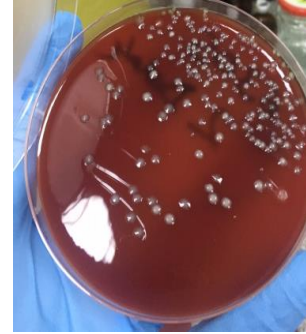
Metot

Bakteriyolojik inceleme

Bakteri izolasyonu ve identifikasyonu amacıyla kullanılan besiyeri ve kimyasallar İstanbul Pendik Veteriner Kontrol Enstitüsü'nden temin edildi. Numuneler, laboratuvara ulaşmasını takiben ilk 12 saat içinde, bakteriyel kültür metodu ile incelemeye alındı. % 5'lik koyun kanlı agara (B37.04.23, PENVET, Türkiye) ve Mac Conkey agara (B42.04.23, PENVET, Türkiye) ekim yapıldı. Ekimi yapılan besi yerleri 37°C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkübe edildi. Koloni morfolojisi incelenerek, kültürde tek tip koloni üremesi (Fotoğraf 1) görülen numuneler, çalışma kapsamında değerlendirildi. Gram boyama için hazırlanmış preparatların mikroskopik morfolojileri incelendi. Bakterilerin identifikasyonu amacıyla klasik bakteriyolojik yöntemler kullanıldı. Gram pozitif kokların ayırımında katalaz, oksidaz test kiti (88029N, Liofilchem, İtalya), koagulaz testleri ve Gram negatif kok, basıl, diplokok ya da kokobasillerin ayırımında Motility (Hareket) kontrolüne ilave olarak

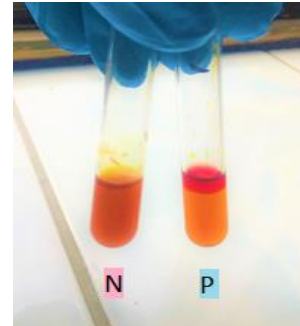
karbonhidrat fermentasyon testleri, Üre testi (Fotoğraf 2), SIM test (Sim medium; B54.04.23, PENVET, Türkiye), İndol testi uygulandı (Holt ve ark. 1994, Queen ve ark. 2011). Biyokimyasal test sonuçlarını doğrulamak amacıyla rutin çalışmalarımızda da uygulanan otomatik identifikasyon sistemi (Vitek 2, Biomerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) ile çalışıldı. Vitek 2 sistemi; Gram (+) ve Gram (-) tanımlama kartları (ID) kullanılarak çalışıldı. Çalışmamızda; Vitek 2 sistemi sonuçlarındaki *Streptococcus* spp. ve *Staphylococcus* spp. izolatları istatistiksel hesaplama kolaylığı açısından cins düzeyinde belirtildi.

İstatistiksel Analiz: Çalışmada incelenen hayvanlardan izole edilen bakterilerin yaş, mevsim ve illere göre dağılımları arasındaki önem kontrolleri, Pearson Chi-Square Test ve Fisher's Exact Test kullanılarak SPSS (IBM 22) programı ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Kocaçalışkan ve Bingöl 2010).



Resim1: *P. multocida* mukoid kolonileri – saf kültür

Figure1: *P. multocida* mucoid colonies – pure culture



Resim 2: Üre negatif reaksiyonunda İndol negatif ve İndol pozitif (N: Negatif, P: Pozitif)

Figure 2: Indole negative and Indole positive image in urea negative reaction (N: Negative, P: Positive)

BULGULAR

Tüm hayvan türlerine ait 152 akciğer örneğinden 2018-2021 yılları boyunca izole edilen bakterilerin oranları; *Streptococcus* spp. %37,5 (n=57), *M. haemolytica* %26,3 (n=40), *P. multocida* %11,8 (n=18), *Staphylococcus* spp. %9,2 (n=14), *P. aeruginosa* %5,3 (n=8), *K. pneumoniae* %5,3 (n=8) ve *Moraxella* spp. %4,6 (n=7) olarak saptandı. Sığırlarda ve keçilerde sırasıyla %53,3 ve %48 olarak *Streptococcus* spp., koyunlarda ise *M. haemolytica* %35,4 ile en fazla oranda izole edilen bakteriler olarak belirlendi (Grafik 1). Her bir hayvan türü için izole edilen/edilmeyen bakteri sayıları ayrı ayrı istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde sığır, koyun ve keçilerden izole edilen ve istatistiksel açıdan anlamlı bulunan ($P \leq 0,001$) farklılıklar Grafik 1’de gösterildi. Dört yıl boyunca çeşitli mevsimlerde izole edilen bakterilerin türe göre dağılımı Tablo 2’de verildi. Bu verilere göre yapılan istatistiksel analiz sonucunda türler kendi arasında değerlendirilmek üzere herhangi bir bakterinin mevsimlere göre dağılımında belirgin fark bulunmadı ($P > 0,05$). Bir yaş altı ve üstü gruplar incelendiğinde 1 yaş altındaki buzağlarda ve oğlaklarda sırasıyla %50 ve %57,1 ile *Streptococcus* spp.’lerin en fazla izole edilen bakteri olduğu, *M. haemolytica*’nın da

%30,6 ile kuzu akciğerlerinde en çok izole edilen bakteri olduğu belirlendi. Buzağlarda *Streptococcus* spp.’i takiben *P. multocida*’nın (%37,5), oğlaklarda ise *M. haemolytica*’nın (%28,6) ikinci en sık izole edilen ajan olduğu, kuzularda da *Streptococcus* spp.’nin (%25) en fazla izole edilen ikinci etken olduğu görüldü. Sığır, koyun ve keçiler yaş gruplarına ayrıldığında, her bir sığır % 100’ü temsil edecek şekilde hesaplanan izolasyon oranları Tablo 3’de verildi. Bu verilere göre, buzağı ve oğlaklarda *Streptococcus* spp., kuzularda ise *M. haemolytica* izolasyonu istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($P \leq 0,05$). Bir yaşından büyük sığır ve keçilerde *Streptococcus* spp., koyunlarda da *M. haemolytica* izolasyon oranları diğer bakteri türleri ile kıyaslandığında istatistiksel olarak belirgin şekilde yüksek olduğu görüldü ($P \leq 0,001$). Şekil 1’de her ilde izole edilen bakterilerin oranları il içinde değerlendirildi. Pnömonili akciğerlerden belirli bir ilde en fazla oranda izole edilen bakteri; *M. haemolytica* Yalova’da %57,1, *Streptococcus* spp. Kırklareli’de %55, *Moraxella* spp. Düzce’de %37,5, *P. multocida* Yalova’da %28,6, *K. pneumoniae* Sakarya’da %25, *Staphylococcus* spp. Kırklareli’nde %20 ve *P. aeruginosa* İstanbul’da %20 olarak belirlendi. Etkenlerin illere göre dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($P > 0,05$).

Tablo 1: Çalışmadaki numunelerin hayvan türü, yaş, mevsim ve geldiği illere göre dağılımı (n=152)

Table 1: Distribution of samples according to animal species, age, season, and province of origin (n=152)

Hayvan Türü		Koyun (n=82)	Keçi (n=25)	Sığır (n=45)
Yaş	<1 yaş	36	7	8
	>1 yaş	46	18	37
Mevsim	İlkbahar	13	9	16
	Yaz	17	3	7
	Sonbahar	16	4	8
	Kış	36	9	14
Geldiği İl	Balıkesir	8	0	4
	Bursa	16	4	4
	Çanakkale	6	5	1
	Düzce	4	0	4
	Edirne	7	2	6
	İstanbul	10	1	4
	Kırklareli	5	6	9
	Kocaeli	9	6	8
	Sakarya	5	1	1
	Tekirdağ	8	0	1
	Yalova	4	0	3

Tablo 2: Sığır, koyun ve keçilerden farklı mevsimde izole edilen bakterilerin yüzde oranları**Table 2:** Percentage of bacterial isolations from cattle, sheep, and goats in different seasons

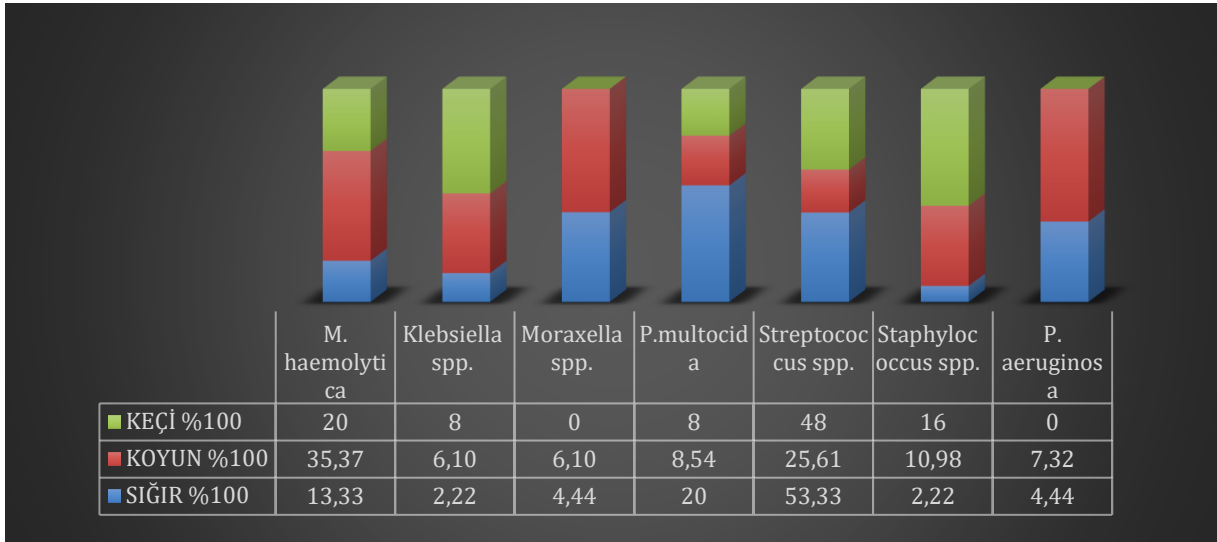
Bakteriler	Sığır – Buzağı (%100)				Koyun – Kuzu (%100)				Keçi – Oğlak (%100)			
	Kış	İlkb	Yaz	Sonb	Kış	İlkb	Yaz	Sonb	Kış	İlkb	Yaz	Sonb
<i>Streptococcus</i> spp.	13,33	26,67	6,67	6,67	12,2	3,66	3,66	6,1	16	20	0	12
<i>M. haemolytica</i>	6,67	2,22	0	4,44	14,63	4,88	10,98	4,88	8	0	8	4
<i>P. multocida</i>	11,11	2,22	6,67	0	2,44	2,44	1,22	2,44	0	8	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	0	0	0	2,22	6,1	3,66	0	1,22	12	4	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	0	0	2,22	2,22	3,66	1,22	1,22	1,22	0	0	0	0
<i>K. pneumonia</i>	0	0	0	2,22	2,44	0	0	3,66	0	4	4	0
<i>Moraxella</i> spp.	0	4,44	0	0	2,44	0	3,66	0	0	0	0	0
TOPLAM	31,11	35,56	15,56	17,78	43,9	15,9	20,7	19,5	36	36	12	16

Sığır, koyun ve keçilerde herhangi bir bakterinin belli bir mevsimde izole edilmiş olması istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (P>0,05). İlkbahar: İlkb, Sonbahar: Sonb olarak kısaltılmıştır.

Tablo 3: İzole edilen bakterilerin hayvan türü ve yaşına göre dağılımı**Table 3:** The distribution of isolated bacteria based on animal species and age

Tür	Yaş	<i>Streptococcus</i> spp.	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Moraxella</i> spp.	P değeri
Buzağı %100	<1 yaş	%50 (n= 4)	0	%37,5 (n= 3)	0	%12,5 (n= 1)	0	0	0,009*
Kuzu %100	<1 yaş	%25 (n= 9)	%30,6 (n= 11)	%8,3 (n= 3)	%13,9 (n= 5)	%5,6 (n= 2)	%11,1 (n= 4)	%5,6 (n= 2)	0,009*
Oğlak %100	<1 yaş	%57,1 (n= 4)	%28,6 (n= 2)	0	0	0	%14,3 (n= 1)	0	0,012*
Sığır %100	> 1 yaş	%54,1 (n= 20)	%16,2 (n=6.)	%16,2 (n= 6)	%2,7 (n= 1)	%2,7 (n= 1)	%2,7 (n= 1)	%5,4 (n= 2)	0,000**
Koyun %100	> 1 yaş	%26,1 (n= 12)	%39,1 (n=18)	%8,7 (n= 4)	%8,7 (n= 4)	%8,7 (n= 4)	%2,2 (n= 1)	%6,5 (n= 3)	0,000**
Keçi %100	> 1 yaş	%44,4 (n= 8)	%16,7 (n= 3)	%11,1 (n= 2)	%22,2 (n= 4)	0	%5,6 (n= 1)	0	0,001**

* P≤ 0,05* ve **P≤ 0,001 ilgili satırda bulunan değerler arası farklılıkların istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermektedir.



Grafik 1: Bu çalışmada izole edilen bakterilerin hayvan türlerine göre dağılım yüzdeleri

Graph 1: The distribution percentages of the bacteria isolated in this study according to animal species



İLLER	Streptococcus spp.	M. haemolytica	P. multocida	Staphylococcus spp.	K. pneumoniae	P. aeruginosa	Moraxella spp.
Balikesir	1	5	2	1	1	1	1
Bursa	10	9	2		1	1	1
Çanakkale	6	2	1	2		1	
Düzce	1	3	1				3
Edirne	6	2	2	1	1	2	1
İstanbul	4	4	1	1	1	3	1
Kırklareli	11	1	3	4	1		
Kocaeli	10	6	2	4			
Sakarya	3	2	1		2		
Tekirdağ	4	2	1	1	1		
Yalova	1	4	2				

Resim 3: Akciğer örneklerinden izole edilen bakterilerin her ildeki dağılım yüzdesi

Figure 3: Percentage distribution of bacteria isolated from lung samples from each province

TARTIŞMA

Sığır, koyun ve keçi yetiştiriciliğinde ekonomik kayıplara da neden olan bakteriyel pnömoni vakalarına sıklıkla rastlanmaktadır. Bakteriyel pnömoni vaka bildirimleri yakından incelendiğinde; çalışmamızdaki *Streptococcus* spp.'nin keçi ve sığırlarda sırasıyla %48 ve %53,33, koyunlarda *M. haemolytica*'nın %35,37 oranı ile birinci sırada olduğu görüldü. Ayrıca bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olarak belirlendi ($P<0,05$). Bu değerler, diğer çalışmalarla kıyaslandığında; sığır ve keçilerde *Streptococcus* spp., koyunlarda ise *M. haemolytica* izolasyon oranlarının yüksek olduğu fark edildi. Bu farklılığın nedeni, önceki çalışmalarda (Kıran ve ark. 1993, Özbey ve Muz 2004, Ülgen ve ark. 1997) pnömoni semptomları gösteren hasta hayvanların mezbahadaki kesimleri sonrası alınan numunelerden, bakteriyel izolasyon yapılması olabilir. Bemani ve ark. (2017) subakut ve kronik pnömoni vakalarını inceledikleri çalışmalarında kronik bronkopnömoni karakterinin, bakteriyel izolasyona ve saf, karışık koloni izolasyonuna olan arttırıcı etkisinin istatistiksel açıdan anlamlı olduğu belirtmiştir. Çalışmamızda, numune gönderen veteriner hekimlerin anamnezde belirttiği gibi kronik solunum problemine bağlı ölüm gerçekleşmesinin ardından izole ettiğimiz etkenlere bağlı sonuçlar; bakteri izolasyon oranımızın daha yüksek olmasına neden olabilir. Koyunlarda önceki yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında ise Bemani ve ark. (2017) İran' da patolojik ve bakteriyolojik inceleme yapılan 65 akciğerden %52, Eser ve ark. (2020)'nın Erzurum'daki pnömonili 100 akciğerden %17, Kıran ve ark. (1993)'nin makroskopik olarak pnömoni tespit edilen 273 akciğerden %2,95, Özbey ve Muz (2004)'un pnömonili 350 koyundan %2,3, Ugouchukwu ve ark. (2017)'nin Nijerya' da 18 pnömoni lezyonu olan akciğerden %19 oranında *M. haemolytica* izole ettikleri görülmektedir.

Çalışmamızda pnömonili keçilerde, mevsimsel ayırım (kış, ilkbahar, sonbahar) gözeterek verilen %12-

%20 arasındaki *Streptococcus* spp. izolasyon oranları, diğer çalışmalarla (Sen ve ark. 2018, Tijjani ve ark. 2012, Ugochukwu ve ark. 2017,) benzerlik göstermektedir. Ancak yıl genelinde keçilerden izole edilen bu etkenin izolasyon oranı Özbey ve Muz (2004)'un %2,7 olarak verdiği bulgularından yüksektir. Bu durum, Özbey ve Muz (2004)'un çalışmalarında sadece eylül-haziran ayları arasındaki izolasyon verilerini kullanması, dolayısıyla mevsimsel farklılıkların sınırlandırılmasından kaynaklanabilir. Bakteri izolasyon oranları ve mevsimsel dağılımları arasındaki ilişkiye bakıldığında, çalışmamızda koyunlarda kış mevsiminde bakteri izolasyon oranlarının daha yüksek olduğu görülmektedir. Keçilerde kış ve ilkbahar eşit oranda (%36), sığırlarda ise ilkbahar aylarındaki izolasyon oranının (%35,6) kıştan yüksek olduğu (%31,1) ancak istatistiksel olarak tüm hayvan türlerinde mevsimler arasındaki izolasyon farklarının anlamlı olmadığı belirlendi ($P>0,05$). Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda (Basha 2011, Booker ve ark. 2008, Tijjani ve ark. 2012) hayvanlar arasında kış aylarında pnömoni olguları ve buna bağlı olarak etken izolasyon oranlarının, iyi havalandırılmayan kapalı ahırlarda sık popülasyonların daha fazla zaman geçirmesi ile artış gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada, yaz aylarında pnömoni olguları ve etken izolasyon oranlarında düşüş görülmesinin, önceki çalışmalar (Gülaydın ve Gürtürk 2018, Özbey ve Muz 2004, Singh ve ark. 2020) ile paralellik gösterdiği görüldü. Ugochukwu ve ark. (2017) mevsimler arası izolasyon farklılıklarını değerlendirirken yağmurlu mevsimlerin kurulara, koyunların keçilere göre daha fazla pnömoni oranına sahip olduğu sonucuna varmaları çalışmalarımızla uyumluluk göstermektedir. Bakteriyel pnömoni prevalansının mevsimlere bağlı değişkenliğini gösteren farklı çalışmalar olmakla birlikte bu çalışmada istatistiksel olarak belirgin ilişki kurulamamıştır.

Özellikle Türkiye’de bu ilişkinin kesinlik kazanması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Genel olarak çalışmamızda, iki farklı yaş grubunu içeren buzağı, sığır, kuzu, koyun, oğlak ve keçi başlıklarındaki etken izolasyon oranları değerlendirildiğinde, bakteriyel izolasyonlar arası farklılıklar istatistiki açıdan anlamlı bulunmuştur ($P \leq 0,05$). Literatür taramalarımız sonucunda pnömoni nedeniyle ölen 1 yaşından küçük hayvanlara dair mevsimsel verileri içeren yeterli sayıda ve güncel bakteriyel izolasyon çalışmasına ulaşamamıştır. Yapılan saha çalışmalarında, genç hayvanlarda solunum sistemi semptomlarının dikkat çekici olmaması sebebiyle pnömoni olgularının septisemi olarak kaydedildiğini ve bu durumun analiz sonuçlarında genç hayvanların daha az değerlendirilmesine neden olduğunu düşündürmektedir (Gazioğlu ve ark. 2016). Türkiye’de yapılan çalışmalarda 1 yaş üstü sığırlarda *Streptococcus* spp. oranını Bulut ve Karaman (2019) %16, Kale ve ark. (2013) %5,4 ve Yaman ve Gülcü (2002) ise %2,01 olarak vermiş ve çalışmamızdaki *Streptococcus* spp. izolasyon oranlarına kıyasla düşük olduğu görülmüştür. Bunun nedeni; materyal olarak mezbahaya gelen hasta hayvanların kullanılmış olması, solunum probleminin azaldığı bilinen yaz mevsiminde numune toplanmış olması olabilir. *P. multocida* yönünden ise çalışmamızda buzağılarda Erbaş ve ark. (2008)’in İzmir’de yaptıkları çalışmada %4,9 izolasyon oranının bu çalışmadaki değerlere göre düşük olmasının nedeni; mezbahadan her yaş grubundaki sığra ait 570 adet intratrakeal svabın alınarak numune çalışılmış olması düşünülebilir. Pnömoniye neden olan patojenlerin izolasyonunda akciğer dokusundan yapılan pozitif izolasyon oranının trakeal svap/lavaj ile yapılanlara göre daha yüksek olduğu bilinmektedir (Asaye ve ark. 2015). Bu nedenle çalışmamızda izolasyon oranımız daha yüksek elde edilmiş olabilir.

Kuzulardaki çalışmamızda %30,6 ile *M. haemolytica* ilk sırada yer alırken, *Streptococcus* spp.’nin %25 ile onu takip ettiği görüldü. Türkiye’de ve diğer ülkelerde yapılan çalışmalara (Lindström ve ark. 2018; Oruç 2006; Ülgen ve ark. 1997) bakıldığında ise *M. haemolytica*’nın %10 ile %63 arasında izolasyon oranlarına sahip olduğu, izolasyon sıklığı anlamında ilk iki etkenden biri oldukları ve bu veriler bakımından çalışmamız ile paralellik gösterdiği anlaşıldı. Çeşitli çalışmalarda farklı izolasyon oranları elde edilmesi bölgesel farklılık, mevsim etkisi ve sürü-çiftlik yönetimi gibi birçok faktöre bağlanabileceği gibi; bu durumun nedeni çalışmamızın güçlü yönünü de oluşturan, numune materyalimizin pnömoni nedeniyle ölmüş hayvanlardan oluşturulması olabilir.

Çalışmamızda ve diğer literatür çalışmalarında görüldüğü üzere bakteriyel izolasyon oranlarındaki belirgin farklılıkların; hesaplama, hayvan sayısı, yaşı, ırkı, nakilleri, iklimsel farklılıklar gibi predispozisyon faktörleri ve yetersiz/uygun olmayan tedavi ile koruma-kontrol eksikliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Mevsimin, bölgedeki yağış alma oranının, sıcaklık ve nemin etkisinin yanı sıra bakım şartlarının, incelenen örnek sayısının, örnek alma yöntemlerinin farklı izolasyon oranlarına etkisi olabilmektedir (Güneş 2018, Singh ve ark. 2020, Snowder ve ark. 2006, Tel ve Keskin 2010). Yaz aylarında hayvanların açık alan meralarda seyrek popülasyon olarak günün çoğunluğunu geçirmeleri ve özellikle sıcak mevsimlerde patojenlerin dış ortamda canlı kalma sürelerinde görülen düşüşlerde pnömoni olgularının azalmasına neden olabilmektedir. *Streptococcus* spp.’lerin çevreden ve üst solunum yolları florasından sıklıkla izole edildikleri bilinmektedir. Özellikle genç hayvanlarda bağışıklık sisteminin tam gelişmemiş olması, stres faktörleri ve biyogüvenlik-hijyen şartlarındaki eksiklikler bu tarz fırsatçı etkenlerin alt solunum yollarından izole edilme olasılığını arttırmakta, sürü-çiftlik yönetimi ve mevsimsel

farklılıklarının etken izolasyon oranlarına etkisi bulunabilmektedir.

İllere göre tüm hayvan türlerinde etken izolasyon oranları incelendiğinde istatistiksel olarak şehirler ile etken türleri arasında anlamlı bir ilişki oluşmadığı görüldü ($P>0,05$). Farklı şehirlerden elde edilen farklı izolasyon oranlarına örneklerin gönderildiği mevsim koşulları, hayvan türleri ve yaş gruplarının farklılığının da etkili olabileceği düşünüldü.

SONUÇ

Bu çalışmanın sonucunda bakterilere bağlı solunum sistemi hastalıklarında *Streptococcus* spp.'nin önemli bir rolü olduğu, pnömöni nedeniyle ölen hayvanlardan özellikle koyunlarda ve kış mevsiminde daha fazla izole edildiği görülmektedir. Pnömoni nedeniyle öldüğü kaydedilen hayvanlardan analize gönderilenlerin çoğu ergin hayvanlar olup, en fazla bildirim aralık, ocak ve şubat aylarında Bursa'dan yapılmıştır. Solunum sistemi hastalıklarının bireysel, çevre ve etken karakterizasyonu dâhilinde çok yönlü olarak düşünülmesi, hastalık ve tedavi yönetimine katkı sağlayacaktır. Çalışmamız sonucunda görüldüğü üzere başta koyun yetiştiricileri olmak üzere hayvancılıkla uğraşan paydaşlara, solunum sistemi hastalıklarının yönetimi üzerine bilgilendirme çalışmalarının yapılmasının, hastalıkla mücadelede ve yüksek ekonomik kayıpların önüne geçilmesinde önemli faktörler olduğu görülmektedir.

Etik Kurul Bilgileri: Bu çalışma “Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik” Madde 8 (k) gereği Etik Kurul iznine tabi değildir. (PEVHADYEK 17.08.2022 tarih ve 270 sayılı karar)

Çalışma Onayı: Tarım ve Orman Bakanlığı 24.08.2022 tarih ve 6732623 sayılı olur.

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

Teşekkür: Bülent EKİZ' e redaksiyon, Orbay SAYI ve M. Gürkan ŞİMŞEK' e analiz destekleri için teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Anonim 2022a.**
<https://hbsapp.tarbil.gov.tr/Modules/TURKVET/Pages/Integration/Integration2.aspx>; Erişim Zamanı: 14.04.2022
- Anonim 2022b.**
<https://biruni.tuik.gov.tr/ilgosterge/?locale=tr>; Erişim zamanı: 15.04.2022.
- Anonim 2022c.**
<https://vetkontrol.tarimorman.gov.tr/konya/Link/3/Nu-munc-Gonderme-Kurallari>; Erişim Zamanı: 04.11.2022
- Asaye M, Biyazen H, Bezie M.** Isolation and Characterization of Respiratory Tract Bacterial Species from Domestic Animals with Pneumonic Lungs from Elphora Abattoir, Ethiopia. International Journal of Microbiological Research. 2015; 6 (1): 13-19.
- Basha OAM.** Some studies on the occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from farm animals. Kafrelsheikh Vet Med J. 2011; 9(2): 1-4.
<https://doi.org/10.21608/KVMJ.2011.110198>
- Bemani E, Esmailzadeh S, Gharibi D, Ghorbanpoor M.** Immunohistochemical and bacteriological investigations of *Mannheimia haemolytica* in sheep bronchopneumonia. Kafkas Univ Vet Fak Derg. 2017; 23(1)
- Booker CW, Abutarbush SM, Morley PS, Jim GK, Pittman TJ, Schunicht OC, Perrett T, Wildman BK, Fenton RK, Guichon PT, Janzen ED.** Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. Can Vet J. 2008; 49: 473-481.
- Bulut İ, Karaman M.** Sığır pnömönilerinin patolojik ve bakteriyolojik yöntemler ile araştırılması. Yüksek lisans tezi, Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir, 2019.
- Dorso L, Rouault M, Barbotin C, Chartier C, Assié S.** Infectious bovine respiratory diseases in Adult cattle: an extensive necropsic and etiological study. Anim. 2021; 11: 2280.
- Erbaş G, Kaya O.** Aydın ve İzmir bölgesindeki sığırlardan *Pasteurella multocida*'nın izolasyonu, tiplendirilmesi ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Bornova Vet Kont Araşt Enst Derg. 2008; 30 (44): 7-14.
- Eser G, Yıldırım S, Sağlam YS, Çelebi D, Yılmaz A.** Koyun pnömönilerinde *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* izolasyonu ve patolojik incelemeler. Atatürk Univ Vet Bil Derg. 2020; 15(2): 122-129.
- Franco MF, Gaeta NC, Alemán MAR, Mellville PA, Timenetsky J, Balara MFA, Gregory L.** Bacteria isolated from the lower respiratory tract of sheep and their relationship to clinical signs of sheep respiratory disease. Livestock Diseases-Pesq. Vet Bras. 2019; 39 (10): 796-801.
- Gazioğlu A, Yüksel H, Kızıl Ö.** Fibrinli pnömöni oğlaklarda *Mycoplasma arginini* ve *Mannheimia haemolytica* enfeksiyonu. Fırat Univ Sağ Bil Vet Derg. 2016; 30 (3): 229 – 232.
- Gülaydın G, Gürtürk K.** Identification of *Pasteurella multocida* strains isolated from respiratory Tract of healthy and diseased cattle and determination of capsular types by PCR in Van region. Van Vet Journ. 2018; 29 (3): 143-146.
- Güneş V.** Buzağı Solunum Sistemi Hastalıkları. Lalahan Hay Araşt Enst Derg. 2018; 58 (Özel Sayı) 35-40.

- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. Bergey's manual of determinative bacteriology. Ed; Hensyl WR, Ninth Ed., Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 1994;147,151,226,228,281,282,532,545.
- Kale M, Öztürk D, Hasırcıoğlu S, Pehlivanoglu F, Turutoglu H. Some viral and bacterial respiratory tract infections of dairy cattle during the summer season. Acta Vet Belgrade. 2013; 63 (2-3): 227-236.
- Kıran MM, Berkin Ş, Kaya O, Dinçer Z. Konya bölgesi koyun pnömonilerinde patolojik ve etiyolojik araştırmalar. SÜ Vet Fak Derg. 1993; 9(1): 3-9.
- Kocaçalışkan İ, Bingöl NA (2010): Biyoistatistik 2. baskı. Nobel yayınları, İstanbul.
- Küçük Baykan Z, Özcan M. Diseases and mortality incidences of calves born from imported brown swiss and simmental Heifers in Western anatolian conditions. Acta Vet Eur. 2019a; 45: 50-55.
- Küçük Baykan Z, Özcan M. Causes of culling and disease incidences at first production year of imported brown swiss and simmental cows from Austria. Kocatepe Vet J. 2019b; 12(2):178-183.
- Lima SF, Teixeira AGV, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. Nature. 2016; 6:29050.
- Lindström L, Asp Tauni F, Vargmar K. Bronchopneumonia in Swedish lambs: a study of pathological changes and bacteriological agents. Acta Vet Scand. 2018; 60: 54.
- Lorenz I, Earley B, Gilmore J, Hogan I, Kennedy E, More SJ. Calf health from birth to weaning. III. Housing and management of calf pneumonia. Ir Vet Jour. 2011; 64: 14.
- Oruç E. The Pathologic and Bacteriologic Comparison of Pneumonia in Lambs. Turk J Vet Anim Sci. 2006; 30: 593-599.
- Özbeç G, Muz A. Pnömonili koyun ve keçilerin akciğerlerinden aerobik bakteri izolasyonları ve izole *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* 'nın Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Saptanması. Turk J Vet Anim Sci. 2004; 28: 209-216.
- Özen H, Karaman M, Şahin M, Özcan K. Pnömonili sığırlarda *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* ve *M. mycoides subsp. mycoides* (küçük koloni tipi)'in PZR ile belirlenerek patolojik bulguların incelenmesi. Kafkas Üniv Vet Fak Derg. 2009; 15 (1): 125-133.
- Queen PJ, Markley BK, Leonard FC, Fitzpatrick EZ, Fanning S, Hartigan PJ (2011): Veterinary microbiology and microbial disease 2nd. Edition. Wiley Blackwell, New York.
- Sen SK, Chowdhury MR, Mahub-E-Elahi ATM, Siddique AB. Bacteriological and histopathological investigation of pneumonia in black bengal goat. J Dair Vet Sci. 2018; 6:4.
- Singh R, Singha S, Singh R, Dhama K, Singh KP, Singh S, Singh V. Epidemiological study of *Mannheimia haemolytica* infection in the sheep and goats population, India. Biol Rhythm Res. 2020; 51(6): 869-878.
- Snowder GD, Vleck LDV, Cundiff LV, Bennett GL. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. J Anim Sci. 2006; 84:1999-2008.
- Taylor JD, Fulton RW, Lehenbauer TW, Step DL, Confer AW. The epidemiology of bovine respiratory disease: what is the evidence for predisposing factors? Can Vet J. 2010; (51): 1095-1102.
- Tel OY, Keskin O. Koyun akciğerlerinden *Pasteurella multocida* ve *Mannheimia haemolytica* izolasyonu ve antibiyotiklere duyarlılığı. YYU Vet Fak Derg. 2010; 21 (1): 31-34.
- Tijjani A, Ameh JA, Gambo HI, Hassan SU, Sadiq MA, Gulani I. Studies on the bacterial flora and pathologic lesions of caprine pneumonic lungs in Maiduguri North-Eastern Nigeria. Afr Jour Microbiol. 2012; 6(48): 7417-7422.
- Ugochukwu IC, Aneke CI, Ezeasor CK, Msheila WP, Idoko SI, Kwabugge AY, Shoyinka SVO, Chineme CN, Chah KF, Ugochukwu EI. Pathomorphology and aerobic bacteria associated with pneumonia in small ruminants slaughtered at the nsukka abattoir. Animal Res Int. 2017; 14(1): 2644 – 2651.
- Ülgen M, Sönmez G, Aydın F. Kuzu pnömonileri üzerinde mikrobiyolojik ve histopatolojik incelemeler. Etlik Vet Mikro Derg. 1997(2): 9.
- Yaman İ, Gülcü HB. Besi danalarında pnömonilerin patolojik ve bakteriyolojik incelenmesi. Vet Bil Derg. 2002; 18(3): 99- 108.

Investigations on Calving Interval and Dry Period in Anatolian Buffaloes Reared in Kütahya Province

Kürşat ALKOYAK^{1*}, Cüneyt KAPTAN², Mehmet Akif YÜKSEL²

¹Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies, Department of Livestock and Aquaculture Research, Ankara, Türkiye,

²Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry, Sheep Breeding Research Institute, Balıkesir, Türkiye

ABSTRACT

The study is intended to determine the calving interval (CI) and Dry period (DP), affecting both production and reproduction characteristics of Anatolian buffaloes reared under farm conditions, to investigate the environmental effects on these characteristics, and to use the results in stud selection programs for breeding in buffalo herds. In the study, 1427 calving interval and dry period records of 756 head of Anatolian buffalo reared between 2014-2021 were used. In this study, the overall mean and standard error of CI and DP were determined as 411.37±4.10 days and 191.70±3.13 days, respectively. The effects of county, calving year, season and parity on these features were determined. In the study, the effect of all environmental factors on CI and DP, apart from the county, was found to be significant ($p<0.01$, $p<0.001$). In the study, concluded that considering the factors affecting yield and reproductive performance in selection programs and monitoring of estrus and drying off by breeders will contribute to farm productivity.

Keywords: Buffalo, calving interval, dry period, environmental factors

Kütahya İlinde Yetiştirilen Anadolu Mandalarında Buzağılama Aralığı ve Kuruda Kalma Süresi Üzerine Araştırmalar

ÖZ

Sunulan çalışmada çiftlik şartlarında yetiştirilen Anadolu mandalarında Buzağılama aralığı (BA) ve üreme ve üretim özelliklerini etkileyen Kuruda kalma süresi (KKS)'ni belirleyerek bu özellikler üzerine etki eden çevresel etkileri araştırmak ve elde edilen sonuçların manda sürülerinde ıslaha yönelik damızlık seçim programlarında kullanma imkanlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 2014-2021 yılları arasında yetiştirilen 756 baş Anadolu mandasına ait 1427 adet Buzağılama aralığı ve Kuruda kalma süresine ait kayıtlar kullanılmıştır. Bu araştırmada, BA ve KKS genel ortalama ve standart hatası sırasıyla 411.37±4.10 gün ve 191.70±3.13 gün olarak belirlenmiştir. İlçe, buzağılama yılı, mevsimi ve laktasyon sırası bu özellikler üzerine etkileri belirlenmiştir. Çalışmada ilçe hariç incelenen tüm çevresel faktörlerin BA ve KKS üzerine etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.01$, $p<0.001$). Çalışmada, seleksiyon programlarında verim ve üreme performansına etki eden faktörlerin dikkate alınması ve yetiştiriciler tarafından östrus ve kurutmanın izlenmesinin çiftlik verimliliğine katkı sağlayacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Buzağılama aralığı, çevresel faktörler, kuruda kalma süresi, manda

To cite this article: Alkoyak K, Kaptan C, Yüksel M.A. Investigations on Calving Interval and Dry Period in Anatolian Buffaloes Reared in Kütahya Province. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):219-225

Submission: 24.12.2022 Accepted: 10.06.2023 Published Online: 13.06.2023

ORCID ID; KA: 0000-0001-6621-6136, CK: 0000-0001-9867-7025, MAY: 0000-0003-3767-5936

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

Buffaloes play a crucial role in ensuring a sustainable food production system in many developing countries (Pasha and Hayat 2012). The buffaloes raised in Türkiye originate from the Mediterranean subgroup of the riverine-type buffaloes, and are called as Anatolian Buffalo (Cicek et al. 2009).

In Türkiye, the number of Anatolian buffaloes was 185.574 in 2021 and they are mostly grown in North, Central, West, East and Southeast Anatolia (Atasever and Erdem 2008, TUIK-Anonymous 2022). The Ministry of Agriculture and Forestry started to implement the "National Anatolian Buffalo Breeding Project" to improve the buffalo breeding. In Türkiye, buffalo breeding is generally carried out for milk production (cream, yogurt, cheese, ice cream). To increase milk yield in buffaloes, it is necessary to know the factors affecting milk production. Milk yield and reproductive characteristics are affected by the factors such as genotype, age, season, nutrition and management (Kumar et al. 2017). Similarly, the economic return of buffalo milk depends on the milk production and reproductive efficiency of the animals, and the reproductive efficiency in buffaloes is affected by the dry period (DP) and especially the calving interval (CI). Indeed, CI is an important parameter used as a fertility index in farms (Ramos et al. 2006, Yılmaz Adkinson and Konca 2021).

Most breeding experts agree that the 13-14 month calving interval is ideal to maximize profitability in buffalo breeding. Also, to obtain optimal milk, approximately 2 months of DP should be left before the next lactation. Shorter or longer DP negatively affects the subsequent lactation yield (Şekerden 2001). Bachman and Schairer (2003) reported that animals with low milk yield tend to stay in dry period for a longer time, while animals with high milk yield do the opposite. Indeed, a dairy animal must have a shorter DP and a lower CI to be economical. In this respect, DP and CI are important economic features that determine the milk yield of buffaloes (Sanker et al. 2014).

There is not enough research on the calving interval and especially on the dry period in Anatolian buffaloes. Therefore, more studies are needed to determine these characteristics of Anatolian buffaloes. The aim of this study is to contribute to stud selection programs in buffalo herds by investigating the reproductive characteristics CI and DP in Anatolian water buffalo reared under farm conditions and the environmental effects on these characteristics.

Location of the study, animals and data collection

The material of the research consists of 1427 CI and DP records of 756 heads of Anatolian buffalo reared in Kütahya province (39° 25' 11" N and 29° 59' 8" E) between 2014-2021. The data were obtained from the "Manda Yıldızı" data registration system, which was created within the scope of the "National Anatolian Buffalo Breeding Project" promoted by the General Directorate of Agricultural Research and Policies (Tekerli 2019).

In the region where the research was carried out, buffalo breeding generally consists of family type enterprises and the number of buffaloes per farm is approximately 5 heads. Buffalo farming is generally carried out in pasture conditions and supplementary feeding is done by giving small amounts of forage available only in winter months (silage, straw, alfalfa, legume grass, etc.). Milking is performed in the morning and evening, mostly by hand and sometimes by machine.

Data between $CI \geq 300$ and ≤ 700 days, and $DP \geq 30$, and ≤ 300 days were used in the study (Poudel et al. 2017, Koçak et al. 2019). CI (days) was calculated as the interval between two consecutive calvings, and DP (days) was calculated as the time from the date of dry off to the subsequent calving.

The study was carried out in 3 counties of Kütahya; (1) Altıntaş, (2) Çelebi, and (3) Tavşanlı. The calving year was divided into four groups: (1) 2014-2015, (2) 2016-2017, (3) 2018-2019, and (4) 2020-2021. The calving seasons were divided into four groups; (1) winter, (2) spring, (3) summer, and (4) autumn. The parity is numerically ranked from 1 to 5.

Statistical analysis

Due to the insufficient data in the subgroups, it was assumed that there was no two- or three-way interaction between the factors examined. The GLM (General Linear Model) method in the "Minitab-Version 18" program package was utilized for the analysis (Minitab 2017). The following model was used to determine the effect of environmental factors on calving interval and dry period.

$$Y_{ijklm} = \mu + C_i + Y_j + S_k + P_l + e_{ijklm} \quad \text{Where;}$$

Y_{ijklm} : Level of CI and DP features of any buffalo (i. county, j. year, k. season, l. Parity, m. The observation value for an investigated trait)

μ : Overall (expected) average,

C_i : The effect of i^{th} county ($i= 1,2,3$),

Y_j : The effect of j^{th} calving year ($j=1, 2, 3, 4$),

S_k : The effect of k^{th} calving season ($i= 1,2,3,4$),

P_l : The effect of l^{th} parity ($l=1, 2, 3, 4, 5$),

e_{ijklm} : Random error which is assumed to be normally independently distributed with zero mean and constant variance (NID, 0, σ^2).

RESULTS

In this study, the least squares means and standard errors for some environmental factors on CI and DP characteristics in Anatolian buffaloes are given in Table 1. CI and DP overall mean and standard error were determined as 411.37 ± 4.10 days and 191.70 ± 3.13 days, respectively (Table 1). The effects

of the county, calving year, season and parity on these characteristics were defined. In the study, the effect of all environmental factors on CI and DP, except the county, was found to be significant ($p < 0.01$, $p < 0.001$) (Table 1).

Table 1. Least squares means of CI and DP according to county, calving year, season, and parity of Anatolian buffaloes

PARAMETER	n	Calving Interval (days)	Dry Period (days)
		Mean \pm SEM	Mean \pm SEM
Overall means	1427	411.37 \pm 4.10	191.70 \pm 3.13
County			
Altıntaş	169	412.97 \pm 6.52	192.15 \pm 4.98
Merkez	691	414.62 \pm 4.08	195.13 \pm 3.12
Tavşanlı	567	406.54 \pm 4.67	187.81 \pm 3.57
P		0.129	0.062
Calving Year			
2014-2015	83	394.61 \pm 8.88 ^c	165.39 \pm 6.78 ^c
2016-2017	369	411.10 \pm 5.22 ^{bc}	194.14 \pm 3.99 ^b
2018-2019	554	415.57 \pm 4.19 ^{ab}	205.52 \pm 3.20 ^a
2020-2021	421	424.21 \pm 4.42 ^a	201.73 \pm 3.38 ^{ab}
P		0.005	0.000
Calving Season			
Winter	58	452.69 \pm 9.85 ^a	221.18 \pm 7.52 ^a
Spring	584	387.58 \pm 3.88 ^c	163.40 \pm 2.96 ^c
Summer	642	383.80 \pm 3.80 ^c	173.01 \pm 2.90 ^b
Autumn	143	421.43 \pm 6.63 ^b	209.20 \pm 5.06 ^a
P		0.000	0.000
Parity			
1 st	524	427.83 \pm 4.24 ^a	206.08 \pm 3.24 ^a
2 nd	394	425.89 \pm 4.90 ^a	205.76 \pm 3.74 ^a
3 rd	270	401.50 \pm 5.51 ^{bc}	183.25 \pm 4.21 ^b
4 th	152	412.25 \pm 6.76 ^b	193.40 \pm 5.16 ^b
5 th ≤	87	389.40 \pm 8.65 ^c	169.98 \pm 6.61 ^c
P		0.000	0.000

a, b, c : Means in a column with different superscripts differ significantly ($p < 0.01$; $p < 0.001$).

DISCUSSION

The CI value determined in this study (411.37 ± 4.10 days) (Table 1) is higher than the study by Marai et al. (2009) (402.6 ± 2.6) and Ayad et al. (2022) (393.75 days) in Egyptian buffaloes. However, it is similar to the researchers conducted by Malhado et al. (2013) (411 days) on Murrah buffaloes in Brazil and by Soysal et al. (2018) (417 days) on Anatolian buffaloes in Türkiye. On the other hand, this value determined in the study is lower than the CI determined by many other researchers. Kandasamy et al. (1993) reported (547.6 ± 6.0 days) in Murrah buffaloes, Sanker et al. (2014) (450.24 ± 1.53 days) reported in Murrah and Diara buffaloes in India; Charlini and Sinniah (2015) (470 ± 4.87 days) reported Murrah, Surti, Nili-Ravi and their crossbred buffaloes in Sri-lanka; and in Anatolian buffaloes in Türkiye, Koçak et al. (2019) (450.35 ± 2.98 days), Alkoyak and Öz (2020) (426.35 ± 2.91 days) and Kaplan (2021) (470.08 ± 9.32) reported.

These variations in CI may result from the differences in genotypes of buffaloes grown in the research locations, in care and feeding conditions in the enterprises, and differences in administrative practices. The average CI value in this study is very close to the ideal calving interval, which allows approximately one calf per year. This result shows that Anatolian buffaloes respond well to good management practices in the region where the breeding project is carried out.

In this study, CI was not significantly ($p > 0.05$) (Table 1) affected by the county. Similar to this research, Sanker et al. (2014) reported that the region did not have a significant effect on CI in the study conducted in Murrah and Diara buffaloes in India; and, in the research on Anatolian buffaloes in Istanbul, Soysal et al. (2018) also reported that the county did not have a significant effect on CI. In this study, although the highest CI value was found in the central county, and the lowest CI value was found in the Tavşanlı county, no statistically significant difference was found between the counties. We can attribute this result to the fact that buffalo breeding in the counties where the study was conducted was carried out with similar methods.

In this research, the effect of calving year on CI was determined to be significant ($p < 0.01$) (Table 1). Similar to this research, the effect of calving year on CI was reported to be significant in Anatolian buffaloes (Soysal et al. 2018, Koçak et al. 2019, Alkoyak and Öz 2020, Kaplan 2021); and in Egyptian buffaloes (Ayad et al. 2022). On the other hand, unlike this study, the effect of calving year on CI was not significant in the studies conducted by Kandasamy et al. (1993) in Murrah buffaloes in India; and in the studies by Marai et al. (2009) on Egypt buffaloes in India. The significant effect of calving year on CI can be attributed to fluctuations in

environmental conditions that have changed over the years in buffalo farms, and particularly to enterprise management procedures, weather, nutritional level and feeding practices (Ahmad and Shafiq 2002). In this study, while the lowest CI values (394.61 ± 8.88 days) were found in 2014-2015, the highest CI values (424.21 ± 4.42 days) were obtained in 2020-2021. The current study, there is a general increase in CI values over the years. This may be due to the fact that the breeders have not paid enough attention to the heat period of the buffaloes in recent years, and preferred to obtain more milk than to make the buffaloes get pregnant.

In this study, the effect of calving season on CI was found to be significant ($p < 0.001$) (Table 1). Similar to this research, the effect of calving season on CI was reported to be significant in Anatolian buffaloes (Teklerli et al. 2001, Koçak et al. 2019, Alkoyak and Öz 2020, Kaplan 2021) in Türkiye and in Egyptian buffaloes (Marai et al. 2009, Ayad et al. 2022). Unlike this study, on the other hand, in the studies by Kandasamy et al. (1993) in Murrah buffaloes in India, and by Soysal et al. (2018) in Anatolian buffaloes in Istanbul, the effect of the calving season on CI was not significant. In our research, the shortest CI period was found in buffaloes calving in summer (383.80 ± 3.80 days), and the longest CI period was found in buffaloes calving in winter (452.69 ± 9.85 days). Studies conducted by some researchers in Anatolian buffaloes in Türkiye have also supported this study by finding the CI period in buffaloes calving in the shortest summer and longest winter seasons (Koçak et al. 2019, Alkoyak and Öz 2020). CI which exists in buffaloes calving in the shortest spring and summer months can be explained by the fact that calving buffaloes show estrus and become pregnant in autumn and winter. In autumn and winter, the decrease in day length and air temperature may cause an increase in reproductive activity in buffaloes. As a matter of fact, it was reported in studies that oestrus is delayed in buffaloes that give birth in spring due to high temperatures, then ovarian activity resumes in the rainy season and winter months, and their pregnancies mostly coincide with the period when the day length is shortened in the autumn and winter months of the year (Sule et al. 2001, Zicarelli 2007).

In this study, the effect of parity on CI was determined to be significant ($p < 0.001$) (Table 1). Similar to this research, the effect of parity on CI was reported to be significant in Anatolian buffaloes (Soysal et al. 2018, Alkoyak and Öz 2020) in Türkiye, in Murrah buffaloes (Kandasamy et al. 1993) in India, in Egyptian buffaloes (Marai et al. 2009, Ayad et al. 2022) in Egypt, in Bangladesh buffaloes (Fakruzzaman et al. 2020), in Murrah and Diara buffaloes (Sanker et al. 2014) in India, and in Venezuela (Nava-Trujillo et al. 2018). On the other hand, unlike this research, Teklerli et al. (2001)

reported that parity did not have a significant effect on CI in the study conducted in Anatolian buffaloes in Türkiye. In our study, the shortest CI period was found as (389.40 ± 8.65) days at $5^{\text{th}} \leq$ parity, and the longest CI period was found as (427.83 ± 4.24) days at 1^{st} parity. In the study, a regular decrease was observed in CI period with increasing parity in general. This result is consistent with the reports of studies conducted by some researchers (Marai et al. 2009, Charlini and Sinniah 2015, Nava-Trujillo et al. 2018). This may be attributed to the lower reproductive performance of buffaloes in the early parity and the increase in reproductive performance due to the advancing age. As a matter of fact, Kandasamy et al. (1993) reported that the reason for the decrease in CI in later parities may result from physiological stability of buffaloes.

In the results obtained in this study, the average DP value (191.70 ± 3.13) days was consistent with the studies by Charlini and Sinniah (2015) in Siri-lanka Surti (185 days) and Surti crosses (199 days) buffaloes, and by Hussain et al. (2006) (194.4 ± 12.37) days in Nili Ravi buffaloes in Pakistan. However, the results of the present study are lower than the values reported in the study conducted in Murrah buffaloes by Kandasamy et al. (1993) (219.3 ± 4.7) days in India. On the other hand, the DP value of our study was higher than the values reported by Marai et al. (2009) (148.7 ± 2.0) days in Egyptian buffaloes, Poudel et al. (2017) (110.9 ± 61.4) days in Murrah crossbred buffaloes in Nepal, Sanker et al. (2014) (144.34 ± 0.77) days in Murrah and Diara buffaloes in India, and by Ayad et al. (2022) in Egyptian buffaloes (98.46 days). However, if a dairy animal is to be economical, it must have a shorter DP (Poudel et al. 2017). A long DP means that the animals have reproductive problems, while a short one means that the calf to be born does not develop sufficiently and the milk yield of the animal decreases after birth. In this respect, the dry period, which affects both milk and fertility, is a feature that should be carefully considered (Karaağaç 2019).

In this study, the effect of counties where Anatolian buffaloes are raised on DP was not found significant ($p > 0.05$) (Table 1). Similar to this research, Sanker et al. (2014) reported that the region did not have a significant effect on DP in a study conducted in Murrah and Diara buffaloes in India. In this study, the longest DP value was obtained in the Central county (195.13 ± 3.12) days, while the shortest DP value was obtained in Tavşanlı (187.81 ± 3.57) days). However, there is no statistically significant difference between the counties and this can be attributed to the similar methods of buffalo breeding and application practices in the counties. In this study, DP was significantly ($p < 0.001$) (Table 1) affected by calving year. Similar to this study, Ayad et al. (2022) founded a significant effect of calving year on DP in Egyptian buffaloes. On the other hand, unlike this research, the effect of calving year on DP was not significant in the

studies by Kandasamy et al. (1993) on Murrah buffaloes in India and Marai et al. (2009) on Egyptian buffaloes. In the study, the shortest DP values (165.39 ± 6.78) days were found in buffaloes calving in 2014-2015, and the longest DP values (205.52 ± 3.20) days were found in buffaloes calving in 2018-2019. In this study, a general increase was observed in DP values as the years passed, and this may be due to the habit of the breeders to dry their buffaloes off earlier than they should in recent years.

In this study, it was revealed that the effect of the season on DP was significant ($p < 0.001$) (Table 1). Consistent with this study, effect of calving season on DP was reported to be significant in the studies by Kandasamy et al. (1993) on Murrah buffaloes in India, and by Ayad et al. (2022) on Egyptian buffaloes. On the other hand, unlike this research, the studies conducted by Thevamanoharan (2002) on Nili-Ravi buffaloes in Pakistan and by Marai et al. (2009) on Egyptian buffaloes showed that the effect of calving season on DP was not significant. In the current research, while the shortest DP values were obtained in buffaloes calving in spring (163.40 ± 2.96) days and summer (173.01 ± 2.90) days, the longest DP values were obtained in buffaloes calving in autumn (209.20 ± 5.06) days and winter (221.18 ± 7.52) days).

The current study, the effect of parity on DP was determined to be significant ($p < 0.001$) (Table 1). Consistent with this study, many researchers supported this study by finding that the effect of parity on DP was significant (Kandasamy et al. 1993, Hussain et al. 2006, Marai et al. 2009, Sanker et al. 2014, Ayad et al. 2022). On the other hand, contrary to this research, some researchers reported that parity did not have a significant effect of parity on DP (Poudel et al. 2017, Fakruzzaman et al. 2020). In this study, the longest DP was found in the first parity (206.08 ± 3.24) days, and the shortest DP was reached at $5^{\text{th}} \leq$ parity (169.98 ± 6.61) days). In general, it is seen that there is a steady decrease in DP value in advancing parities (Table 1). Similar to this study, some researchers reported that there was the longest dry period in buffaloes in the first parity, and a significant shortening was observed in later parities (Kandasamy et al. 1993, Marai et al. 2009, Poudel et al. 2017, Fakruzzaman et al. 2020). These results can be attributed to the fact that the reproductive performance of buffaloes in the early parity is lower than those in the later parity and that the reproductive performance increases due to the progress of the parity. As a matter of fact, Kandasamy et al. (1993) reported that the reason for the decrease in DP in later parities may result from physiological stability of buffaloes.

CONCLUSION

In this study, the best CI and DP values were obtained at 5th ≤ parity with spring and summer seasons. In addition, according to the results of the research, it can be said that the breeders in Tavşanlı county do better practices related to care, feeding and herd management for their buffaloes. It was concluded that the significant factors that affect the reproductive performances will contribute to the increase in the productivity of the farm if they are formulated in stud selection program and if the breeders are more careful in the heat period and dry period of Anatolian buffaloes.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Author Contribution Rate: KA: 40%, CK: 40%, MAY: 20%

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

Acknowledgements: The authors thank Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (project number: TAGEM/43MANDA2012-01), Kütahya Buffalo Breeders Association and Project Technical personnel for their contributions.

REFERENCES

- Ahmad M, Shafiq M.** Effect of season on fertility rate and milk production in Nili-Ravi buffaloes. 23rd Annual Report, Livestock Prod. Res. Inst., 2002, Bahadurnagar, Okara, Pakistan.
- Alkoyak K, Öz S.** The effect of some environmental factors on lactation length, milk yield and calving intervals of Anatolian Buffaloes in Bartın province of Turkey. *Livestock Studies*, 2020; 60(2), 54-61.
- Anonymous.** Turkish Statistical Institute Statistics. <http://www.turkstat.gov.tr/Start.do>; Accession date: 08.03.2022.
- Atasever S, Erdem H.** Water buffalo raising and its future in Turkey, *Anadolu J Agric Sci*, 2008; 23(1), 59-64.
- Ayad A, Abd-Allah M, Kamal M.** Non-genetic factors affecting phenotypic parameters of milk production and reproductive performance in lactating Egyptian buffaloes. *AASJ*, 2022; 5(1), 10-24.
- Bachman KC, Schairer ML.** Invited review: bovine studies on optimal lengths of dry periods. *J Dairy Sci*, 2003; 86(10), 3027-3037.
- Charlini BC, Sinniah J.** Performance of Murrah, Surti, Nili-Ravi buffaloes and their crosses in the intermediate zone of Sri Lanka. *LRRD*, 2015; 27(3), 47.
- Cicek H, Gunlu A, Tandogan M.** Production function analysis of buffalo fattening enterprises in Afyonkarahisar region of Turkey. *J Anim Vet Adv*, 2009; 8(11), 2158-2163.
- Fakruzzaman M, Sufian MKNB, Akter QS, Paul RC, et al.** Effect of parity on productive and reproductive performance of buffaloes reared under farmers' management at coastal districts in Bangladesh. *IOSR-JAVS*, 2020; 13(4), 21-23.
- Hussain Z, Javed K, Hussain SMI, Kiyani GS.** Some environmental effects on productive performance of Nili-Ravi buffaloes in Azad Kashmir. *J. Anim. Plant Sci.* 2006; 16(3-4), 66- 69.
- Kandasamy N, Lagaiathan VU, Krishnan AR.** Nongenetic factors affecting calving interval and dry period of Murrah buffaloes. *Buffalo Bull*, 1993; 12(3), 63-65.
- Kaplan Y.** Yozgat İli Anadolu Mandalarında Bazı Büyüme, Üreme Ve Üretim Özelliklerini Etkileyen Genetik Ve Çevresel Faktörlerin Tahmini. Doktora Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyonkarahisar, 2021.
- Karaağaç M.** Kırşehirde yetiştirilen siyah alaca sığırlarda genetik parametre tahminleri. Master's thesis, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kırşehir, 2019.
- Koçak S, Tekerli M, Çelikeloğlu K, Erdoğan M, et al.** An investigation on yield and composition of milk, calving interval and repeatabilities in riverine buffaloes of Anatolia. *J. Anim. Plant Sci*, 2019; 29(3), 650-656.
- Kumar M, Ratwan P, Patil CS, Vohra V.** Influence of environmental factors on performance traits in Murrah buffaloes: A review. *J. Vet. Science and Technology* 2017; 6(1), 6-16.
- Malhado CHM, Malhado ACM, Ramos ADA, Carneiro PLS, et al.** Genetic parameters for milk yield, lactation length and calving intervals of Murrah buffaloes from Brazil. *R. Bras. Zootec*, 2013; 42(8), 565-569.
- Marai IFM, Daader AH, Soliman AM, El-Menshawy SMS.** Non-genetic factors affecting growth and reproduction traits of buffaloes under dry management housing (in sub-tropical environment) in Egypt. *LRRD*, 2009; 21 (3).
- Minitab.** Minitab statistical software version 18.1, 2017.
- Nava-Trujillo H, Escalona-Muñoz J, Carrillo-Fernández F, Parra-Oliviero A.** Effect of parity on productive performance and calving interval in water buffaloes. *J. Buffalo Sci*, 2018; 7(1), 13-6.
- Pasha TN, Hayat Z.** Present situation and future perspective of buffaloes production in Asia. *J plant Anim Science*, 2012; 22, 250-256.

- Poudel D, Bhattarai N, Kaphle K, Sapkota S, et al.** Effect of parity on lactational efficiency of Murrah crossbred buffaloes (*Bubalus bubalis*) in central Nepal. *Int. J. Agr. Forest*, 2017; 7(6), 140-144.
- Ramos AA, Malhado CHM, Carneiro PLS, Gonçalves HC, et al.** Phenotypic and genetic characterization of the milk yield and calving interval in buffalo of the Murrah breed. *Pesq Agropec Bras*, 2006; 41(8), 1261-1267.
- Sanker S, Kumar D, Mandal KG, Taggar RK, et al.** Factors influencing the dry period and calving interval indifferent grades of buffaloes. *Buffalo Bull*, 2014; 33(1), 120-126.
- Soysal Mİ, Genç S, Aksel M, Özkan Ünal E, et al.** Effect of environmental factors on lactation milk yield, lactation length and calving interval of Anatolian buffalo in Istanbul. *JASP*, 2018; 1(1), 93-97.
- Sule SR, Taparia AL, Tailor SS.** Reproductive status of Surti buffaloes maintained under sub-humid conditions of Rajasthan. *Indian Vet J*, 2001; 78, 1049-1051.
- Şekerden Ö.** Büyükbaş Hayvan Yetiştirme (Manda Yetiştiriciliği). *Temizyürek Ofset Matbaacılık, Hatay, Türkiye*, 2001; pp. 1- 12.
- Thevamanoharan K.** Genetic analysis of performance traits of swamp and Riverine buffalo. Ph. D Thesis, Katholieke University Leuven, Belgium, 2002.
- Tekerli M, Küçükkebabçı M, Akalın NH, Koçak S.** Effects of environmental factors on some milk production traits, persistency and calving interval of Anatolian buffaloes. *Livest Prod Sci*, 2001; 68, 275–281.
- Tekerli M.** Manda Yıldızı data records, account and project tracking program, v5.04, 2019.
- Yılmaz Adkinson A, Konca Y.** *Süçü Manda Irklarının Performans, Süt Verimini ve Kalitesini Etkileyen Faktörler ve Türkiye'deki Geleceği. EJO SAT*, 2021; 25, 498-508.
- Zicarelli L.** Can we consider buffalo a non-precocious and hypofertile species? *Ital J Anim Sci*, 2007; 6, 143–54.

The Effect of Accessory Leaves on Digestion Degree and Fermentation Parameters at Increasing Levels on Sheep TMRs

Tuğba BAKIR¹, Bilal SELÇUK¹, Yakup BİLAL¹, Hülya AKÇAM¹

¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Kahramanmaraş Sütçü İmam, 46100, Kahramanmaraş, Türkiye

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effects of substituting acacia (*Robinia pseudocacia* L.) tree leaves for alfalfa hay in sheep TMR (Total Mixed Ration) on gas production (GP), methane production (CH₄), true digestible dry matter (TDDM), partitioning factor (PF), microbial protein (MP), microbial protein synthesis efficiency (MPSE), and true digestibility (TD) parameters using the in vitro gas production technique. In this study, acacia tree leaves were substituted 0, 7.5, 15 and 22.5% for sheep TMRs instead of alfalfa hay. Gas production and methane production values ranged from 62.97 to 74.32 ml, and 9.52 to 11.76 ml, respectively. The degree of digestion varied between 51.67% and 56.67%. The partitioning factor value changed between 4.00 and 4.33, respectively. Microbial protein production and microbial protein synthesis efficiency values varied between 103.67 and 137.00 mg, 41.00% and 51.67%, respectively. True digestible dry matter values ranged from 242.33 to 265.33 mg. The findings in the study showed no anti-methanogenic effect. Based on the results of the present study, it was difficult to determine the appropriate dose in sheep TMRs due to the high tannin content of acacia tree leaves. For this reason, in vivo trials are needed to determine the effects of acacia tree leaves on sheep performance.

Keywords: Gas production, In vitro Microbial protein, Partitioning factor, Tree leaves

Koyun TMR'larına Artan Seviyelerde Akasya Ağaç Yapraklarının Sindirim Derecesi ve Fermentasyon Parametrelerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışmanın amacı koyun TMR'larında akasya (*Robinia pseudocacia* L.) ağaç yapraklarının yonca kuru otu yerine ikame edilmesiyle gaz üretimi (GÜ), metan üretimi (CH₄), gerçek sindirilebilir kuru madde (GSKM), taksimat faktörü (TF), mikrobiyal protein (MP), mikrobiyal protein sentezleme etkinliği (MPSE) ve gerçek sindirim derecesi (GSD) parametrelerine etkilerini in vitro gaz üretim tekniği ile belirlemektir. Bu çalışmada akasya ağaç yaprakları %0, 7.5, 15 ve 22.5 oranında koyun TMR larına yonca kuru otu yerine ikame edilmiştir. Gaz üretimi ile metan üretim değerleri sırasıyla 62.97-74.32 ml ve 9.52-11.76 ml arasında değişmiştir. Sindirim derecesi ise %51.67 ile 56.67 arasında değişmiştir. Taksimat faktörü değeri sırasıyla 4.00- 4.33 arasında değişmiştir. Mikrobiyal protein üretim ve mikrobiyal protein sentezleme etkinliği değerleri sırasıyla 103.67-137.00 mg ve %41.00-51.67 arasında değişmiştir. Gerçek sindirilebilir kuru madde değerleri ise 242.33 ile 265.33 mg arasında değişmiştir. Çalışmadaki bulgular hiçbir anti-metanojenik bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçları baz alınarak akasya ağaç yapraklarının içerdiği yüksek tanenden dolayı koyun TMR'larında uygun dozun belirlenmesi oldukça zor görülmüştür. Bu sebeple akasya ağaç yapraklarının koyun performanslarına etkilerini belirlemek için in vivo denemelerine ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Ağaç yaprakları, Gaz üretimi, İn vitro, Mikrobiyal protein, Taksimat faktörü

To cite this article: Bakır T, Selçuk B, Bilal Y, Akçam H. The Effect of Accessory Leaves on Digestion Degree and Fermentation Parameters at Increasing Levels on Sheep TMRs. (2023) 16(2):226-233

Submission: 17.01.2023

Accepted: 10.06.2023

Published Online: 13.06.2022

ORCID ID; TB: 0000-0003-2185-7137 BS: 0000-0001-9136-5707 YB: 0000-0001-9785-5395 HA: 0000-0002-6784-1782

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

GİRİŞ

Hayvancılık işletmelerinin giderlerinin büyük bir çoğunluğunu (%70-75) yem maliyetleri oluşturmaktadır (Alçıçek ve ark., 2010). Yem maliyetlerinin azaltılarak karlı bir hayvancılık yapılabilmesi için ucuz ve kaliteli yem kaynaklarının oluşturulması gerekmektedir. Bu yem kaynaklarının en başında ise kaba yem üretimi gelmektedir. Hayvancılık işletmelerinde kaba yem üretimi yetersiz olduğundan Türkiye’de kaba yem eksikliği hayvanlara fazla kesif yem verilmesi ile giderilmeye çalışılmaktadır (Özgen, 1986). Hâlbuki geviş getiren hayvanlara fazla kesif yem verilmesi hayvancılığın karlı bir duruma gelmesini sağlamayacaktır. Hem işletme maliyetlerini arttıracak hem de sindirim sistemi hastalıklarına yol açacaktır. Kaba yemler; doğal haliyle su içeriği %20’ den az olan ve kuru madde içeriğinde ham selüloz miktarının %18’ den fazla olduğu yemlerdir (Harmanşah, 2018). Kaba yem kaynaklarının en başında çayır ve meralar gelmektedir. Fakat çayır ve mera alanlarının aşırı derecede otlatılması ve gerekli bakımlarının yapılmaması geviş getiren hayvanların kaba yem açığını kapatamamaktadır. Son zamanlarda yem fiyatlarında görülen artışlar hayvan beslemecileri alternatif yem kaynaklarına yöneltmektedir. Bu alternatif yem kaynaklarından birisi de ağaç dal ve yapraklarıdır. Kaba yemlerin yetersiz olduğu durumlarda ağaç yaprak ve dallarının hayvan beslemede kullanıldığı bildirilmektedir (Temel ve Kır, 2015). Ağaç dal ve yaprakları doğanın ekolojik dengesini sağlamasının yanında geviş getiren hayvanların beslenmesinde de önemli bir görev üstlenmektedir (İpçak ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarda bazı mücbir sebeplere bağlı olarak yem maddelerinin yetersiz olduğu dönemlerde ağaç dal ve yapraklarının hayvanların rasyonlarında bulundurulmasının zaruri olduğu bildirilmiştir (Kamalak ve ark., 2005; Ülger ve ark., 2017). Ağaç dal ve yapraklarının ani iklim değişikliklerinden az

etkilenmeleri gibi avantajlarının olmasının yanı sıra bazı dezavantajlarının da bulunduğu birçok araştırmada bildirilmiştir (Özelçam ve ark., 2019). Geviş getiren hayvanların rasyonlarında kullanılmasını kısıtlayan bazı etkenlerin olduğu ve bu etkenlerin de hem hayvanlara hem de çevreye olumsuz etkilerinin olduğu vurgulanmaktadır (Tolera ve ark., 1997). Bu etkenlerin başında ise ağaç dal ve yapraklarının içeriklerinde yüksek miktarda tanen ve fenolik bileşiklerin olması hayvanların yem tüketimini kısıtlamakta, yemlerin sindirim derecelerini etkilemekte ve zehirlenmelere neden olmaktadır (Balıkcı ve Gürdoğan, 2003). Ülkemizdeki hayvan varlığı dikkate alınarak çayır – meralardan ve tarım arazilerinden yeterince kaba yem üretilmemesine bağlı olarak ağaç dal ve yapraklarının içeriklerinin araştırılarak geviş getiren hayvanların beslenmesinde rasyonlara katılacağı fikri ortaya çıkmıştır. Akasya ağacı (*Robinia pseudoacacia*) Türkiye’ de İç Anadolu ve Anadolu’nun birçok bölgesinde yetişme becerisine sahip olduğu bildirilmiştir (Atay, 1985). Akasya ağacı hayvancılık ve ormancılık endüstrisinde kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada akasya ağaç yapraklarının protein içeriklerinin %13.52-18.88 arasında değiştiği, metabolik enerji içeriklerinin ise 6.06-7.16 MJ/kg arasında olduğu bildirilmiştir (Kamalak ve Başer, 2020).

Bu çalışmada koyun TMR larına akasya ağacının artan oranlarda yonca kuru otu yerine kullanılması ile fermentasyon parametrelerine, rumen mikrobiyal biyokütlesine ve sindirim derecelerine etkisi araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada kullanılan akasya ağaç yaprakları 2022 yılı Haziran ayında Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Avşar yerleşkesinde bulunan 5 ayrı

ağaçtan toplanılmıştır. Toplanan akasya ağaç yaprakları laboratuvara getirilerek gölgede kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan yapraklar 1 mm'lik elekli değirmende öğütülmüştür. Öğütme işleminden sonra akasya ağaç yaprakları ve TMR'ları oluşturan yem ham maddelerinin kimyasal içerikleri ham protein (HP), ham kül (HK), ham yağ (HY) ve kurutulmuş kuru madde (KKM) AOAC (1990)'a göre yapılmıştır. Akasya ağaç yaprakları ve yonca kuru otunun kondanse tanen içerikleri Makkar ve ark., (1995)'nin bildirdiği yöntemle göre belirlenmiştir. TMR'ları oluşturan yem ham maddelerinin metabolik enerji ve ham protein içerikleri Tablo 1'de verilmiştir.

Yem ham maddelerinin metabolik enerji değerleri Menke ve Steingass (1988)'in bildirdiği yöntem ile belirlenmiştir.

$$ME \text{ (MJ/kg KM)} = (1.68 + 0.1418 \cdot G\ddot{U}) + (0.073 \cdot HP) + (0.217 \cdot HY) - (0.028 \cdot HK)$$

GÜ: Gaz üretimi (200mg KM)

HP(%): Ham protein

HY(%): Ham yağ

HK(%): Ham kül

Örneklerin kimyasal içerikleri kullanılarak NRC (2007)'ye göre koyun TMR'ları izokalorik ve izonitrojenik olacak şekilde % 16.5 HP ve 2500 kcal/kg enerjiye sahip 4 ayrı TMR hazırlanmıştır. TMR'lar naylon torbalara yerleştirilmiştir. TMR'larda kullanılan yem ham maddelerinin miktarları tablo 2'de verilmiştir.

Araştırmada kullanılan TMR'ların gaz üretimleri Menke ve ark., (1979)'a göre in vitro gaz üretim tekniği kullanılarak yapılmıştır. 4 tekerrürlü olacak şekilde 0.5 gr yem örneklerini 100 ml cam şırıngalara 40 ml tamponlanmış rumen sıvısı ile karıştırılarak 39°C'de su banyosunda 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Rumen sıvısı Kahramanmaraş ilindeki özel bir kesimhaneden 3 baş ivesi ırkı koyunlardan alınmıştır. Seçilen koyunlar 55-65 kg arasında canlı ağırlığındadır. Koyunlar kesildikten hemen sonra rumen içerikleri 39°C'lik

termos yardımıyla laboratuvara getirilmiştir. TMR'ların 24 saatlik inkübasyon sonucu cam şırıngalarda oluşan gazın metan içeriği Goel ve ark., (2008)'nin bildirdiği yöntemle kızılötesi metan ölçüm cihazı (Sensor Europe GmbH, Erkrath, Germany) kullanılarak belirlenmiştir.

Metan (ml) miktarları aşağıda belirtilen formüle göre hesaplanmıştır.

$$CH_4 \text{ (ml)} = G\ddot{U} \cdot CH_4 \text{ (\%)}$$

Yirmi dört saatlik inkübasyon sonucu cam şırıngalardaki TMR'ları içeren rumen inokulantları cam beherlere koyulmuştur. Üzerine 50 ml NDF çözeltisi eklenerek 1 saat boyunca hot plate cihazında kaynatılma işlemine bırakılmıştır. Kaynatılan rumen inokulantları darası alınan por cam krozeler yardımıyla süzülmüştür. Süzülen cam krozeler 65°C'de 1 gün boyunca kurutulmaya bırakılmıştır. TMR'ların gerçek sindirilebilir kuru madde (GSKM), gerçek sindirim derecesi (GSD), taksimat faktörü (TF), mikrobiyal protein (MP) ve mikrobiyal protein sentezleme etkinliği (MPSE) değerleri Blümmel ve ark. (1997)'i tarafından bildirilen formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$GSKM \text{ (mg)} = \text{İnkübasyon edilmiş substrat miktarı (mg)} - \text{Substrat miktarı (mg)}$$

$$GSD \text{ (\%)} = \frac{GSKM}{\text{İnkübasyon edilmiş substrat miktarı (mg)}}$$

$$TF = \frac{GSD}{G\ddot{U}}$$

$$MP \text{ (mg)} = (GSD - (2.2 \cdot G\ddot{U}))$$

$$MPSE \text{ (\%)} = \frac{((GSD - (2.2 \cdot G\ddot{U}))/GSD) \cdot 100}{GSD}$$

İstatistik Analizi

Araştırmadaki in vitro bulgular SPSS v 20.0 programı (IBM Corp., Armonk, NY, ABD) yardımıyla tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabii tutulmuştur. Ortalamalar arasındaki farklar (P<0.05) Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir (Duncan, 1955).

BULGULAR

Rasyonu oluşturan yem ham maddelerinin kimyasal içerikleri Tablo 3' te verilmiştir.

Akasya ağaç yapraklarının ham kül değeri %6.15 bulunmuştur, Akasya ağaç yapraklarının ham protein değerleri %21.34 bulunmuştur. Araştırmaya konu olan akasya ağaç yapraklarının yonca kuru otu yerine ikame edilmesi ile fermentasyon ve sindirim parametreleri Tablo 4' te verilmiştir.

Çalışmadaki *in vitro* bulgular akasya ağaç yaprağının yonca kuru otu yerine ikame edilmesi ile TMR' ların 24 saatlik fermentasyon sonucu oluşan gaz üretim değerleri 64.07 ile 74.32 ml arasında değişmiştir (linear, P = 0.00; quadratic, P = 0.00; cubic, P = 0.16), TMR' ların 24 saatlik fermentasyon sonucu oluşan net metan miktarları 9.52 ile 11.76 ml arasında değişmiştir (linear, P = 0.02; quadratic, P = 0.00; cubic, P = 0.82).

TMR' larda gerçek sindirilebilir kuru madde miktarları 242.33 ile 265.33 mg KM arasında değişmiştir (linear, P = 0.82; quadratic, P = 0.00; cubic, P = 0.52). En yüksek gerçek sindirilebilir kuru madde TMR 2' de gözlemlenirken, en düşük gerçek sindirilebilir kuru madde TMR 1' de görülmüştür. Çalışmadaki TF değerlerinin 4.00 ile 4.33 arasında değiştiği gözlemlenmiştir (linear, P = 0.66; quadratic, P = 0.34; cubic, P = 0.21). TMR' larda ki mikrobiyal protein değerleri 103.67 ile 137.00 mg arasında değişmiştir (linear, P = 0.06; quadratic, P = 0.02; cubic, P = 0.03). En yüksek MP değeri TMR 2' de, en düşük MP değeri ise TMR 3' de gözlemlenmiştir. TMR' ların MPSE değerleri %41.00 ile 51.67 arasında oluşmuştur (linear, P = 0.00; quadratic, P = 0.00 cubic, P = 0.00). Bu çalışmada TMR larda kullanılan akasya ağaç yapraklarının artmasıyla TMR 0' a göre TMR 4' te MPSE oranının düştüğü gözlemlenmiştir.

Tablo 1. Yem ham maddelerinin metabolik enerji ve ham protein değerleri

Table1. Metabolic energy and crude protein values of feed raw materials

Yem ham maddeleri	Metabolik Enerji (Mj / kg)	Ham Protein
Pamuk tohumu küspesi	10.02	25.19
Akasya ağaç yaprakları	8.58	21.34
Buğday kepeği	12.69	15.53
Yulaf dane	11.88	10.88
Yonca	9.87	13.42

Tablo 2.TMR' ları oluşturan yem hammaddelerinin miktarları (gr)**Table 2.** Amounts of feed raw materials that make up TMRs (gr)

YEM ÖRNEKLERİ	TMR I (%0)	TMR II (% 7.5)	TMR III (%15)	TMR IV (% 22.5)
PTK	311.88	272.15	232.43	192.70
Akasya yaprağı	0	75	150	225
Yonca	550	475	400	325
Yulaf dane	2.71	47.92	93.14	138.35
Buğday kepeği	79.40	73.91	68.42	62.93
Yağ	30	30	30	30
Tuz	10	10	10	10
Kireç Taşı	15	15	15	15
Min-Vit	1	1	1	1
Toplam (gr)	1000	1000	1000	1000
ME (kcal/kg KM)	2500	2500	2500	2500
HP (%)	16.5	16.5	16.5	16.5

PTK: Pamuk tohumu küspesi, Min-Vit: Mineral ve Vitamin, ME: Metabolik enerji, HP: Ham protein

Tablo 3. TMR' ları oluşturan yem ham maddelerinin kimyasal içerikleri.**Table 3.** Chemical contents of feed raw materials that make up TMRs.

	KKM (%)	HP (%)	HY (%)	HK (%)	KT (%)	GÜ(ml)
Akasya	94.64	21.34	4.23	6.15	12.55	32.32
Yonca	94.41	13.42	1.92	8.39	0.82	47.70
PTK	93.46	25.19	8.66	7.17		34.03
Yulaf dane	92.53	10.07	5.04	3.41		58.75
Buğday kepeği	91.12	14.16	2.45	3.11		66.24

KKM(%): Kurutulmuş kuru madde, HP(%): Ham protein, HY(%): Ham yağ, HK(%): Ham kül, KT(%): Kondanse tanen, GÜ: Yirmi dört saatlik gaz üretimi 200 mg/KM

Tablo 4. TMR' ların fermentasyon ve sindirim parametreleri**Table 4.** Fermentation and digestion parameters of TMRs

TMR	GÜ	Metan(ml)	Metan(%)	GSKM(mg)	TF	MP (mg)	MPSE(%)	GSD (%)
TMR 0	65.53 ^b	10.44 ^a	15.93	255.67 ^{ab}	4.00	125.00 ^{bc}	48.67 ^{bc}	54.67 ^{ab}
TMR 1	62.97 ^a	9.52 ^a	15.13	242.33 ^a	4.00	116.00 ^{ab}	47.67 ^b	51.67 ^a
TMR 2	64.07 ^{ab}	9.63 ^a	15.02	265.33 ^b	4.33	137.00 ^c	51.67 ^c	56.67 ^b
TMR 3	74.32 ^c	11.76 ^b	15.83	252.33 ^{ab}	4.00	103.67 ^a	41.00 ^a	53.67 ^{ab}
SEM	1.12	0.35	0.38	6.54	0.23	6.44	1.41	1.31
L sig,	000	020	829	548	667	068	003	643
Q sig,	000	002	008	972	347	028	001	1.000
C sig,	167	829	521	008	217	003	002	005

^{a,b,c} Aynı satırlarda yer alan farklı simgeye sahip olan ortalamalar birbirinden farklıdır, TMR 0: Kontrol grubu, TMR1: % 7.5 akasya, TMR 2: % 15 akasya, TMR 3: % 22.5 akasya, GÜ: Gaz üretimi(500mg/ KM), GSKM: Gerçek sindirilebilir kuru madde (500 mg/ KM), TF: Taksimat faktörü, MP: Mikrobiyal protein (mg), MPSE: Mikrobiyal protein sentezleme etkinliği (%) ve GSD: Gerçek sindirim derecesi (%) (P<0.05)

TARTIŞMA

Bu çalışmada kullanılan akasya ağaç yaprağının ham kül değerleri Denek ve ark. (2014)' nın bildirmiş olduğu ham kül değerinden düşük bulunmuştur. Yem ham maddelerinin ham kül değerleri %17 ve üzerinde olduğu durumlarda yemlerin yabancı maddeler ile kontaminasyonunun olacağı bildirilmiştir (Kılıç, 2016). Yapılan bir çalışmada akasya ağaç yapraklarının ham protein değeri %19.93 bulunmuştur (Zebari, 2015). Yem ham maddelerinin ham protein değerlerinin %8 ve altında olması durumunda rumende bulunan mikroorganizmalarının enzimsel faaliyetlerinin kısıtlanarak rumende ihtiyaç duyulan amonyak miktarının karşılanamayacağı bildirilmiştir (Norton, 2003; Cappelozza ark., 2013). Yemlerin gaz üretimi besin maddelerinde bulunan karbonhidratların fermantasyon sonucu oluşan uçucu yağ asitlerinin tampon çözeltilerle reaksiyona girmesi ile oluşmaktadır (Wolin, 1960). Rumende gaz üretiminin artması ile fermente olabilen karbonhidrat miktarının artabileceği bildirilmiştir (Sampath, 1995). Lopez ve ark., (2010)' nın yapmış olduğu çalışmada yem ham maddelerini anti-metanojenik özelliklerine göre sınıflandırmıştır. Sınıflandırmaya göre %11-14 arası düşük, %6-11 arası orta ve %0-6 arasında bulunan yem ham maddeleri yüksek anti-metanojenik karaktere sahiptir. Çalışmadaki bulgular Lopez ve ark., (2010)' nın sınıflandırmasına göre hiçbir anti-metanojenik bir etki göstermediği tespit edilmiştir. Ayrıca yapılan bir çalışmada rumende fermantasyon sonucu oluşan metan gazının düşmesi; tanenlerin metan üreten mikroorganizmaların yapısında bulunan proteinlere ve enzimlere bağlanarak bakterileri öldürmesi ya da bakterilerin çoğalmalarının engellenmesinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Tavendale ve ark., 2005). Yapılan bu çalışmada TMR' a akasya ağaç yapraklarının yonca kuru otu yerine ikame edilmesi ile metan gazı oluşumunu TMR 0' a kıyasla TMR 1'in % 8 düşürdüğü tespit edilmiştir. Carulla ve ark., (2005)' nın yapmış olduğu araştırmada

TMR' a %0.025 akasya yaprağı taneni ilave edilerek fermantasyon sonucu ortaya çıkan metan gazı salınımını %13 seviyelerinde düşürdüğü bildirilmiştir. Tanenlerin geviş getiren hayvanlarda yem ham maddelerinin lezzetini ve sindirim derecesini düşürdüğü bildirilmiştir (Öztürk, 2015). Yapılan bir çalışmada ruminant hayvanların rasyonlarında kondanse tanen miktarının %3' e kadar kullanılması durumunda, rumen içerisindeki mikrobiyal aktiviteyi olumlu yönde etkileyeceği bildirilmiştir. Ancak bu oranın %3' ün üzerine çıkılması durumunda hayvanlarda toksik etkilere neden olacağı belirtilmiştir (Makkar ve ark., 2003; Jayanegara ve ark., 2012).

NRC (2007)' e göre geviş getiren hayvanların diyetlerinde kaba-kesif yem oranının 60/40 olması gerektiği bildirilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılan akasya ağaç yaprakları NRC (2007)' e göre rasyonların en yüksek %30' unu oluşturmaktadır. Bu nedenle rasyonlarda kullanıldığında rasyonlarda %3' ü geçmediği ve istenilen seviyede olduğu tespit edilmiştir. TMR' larda artan akasya ağaç yaprakları oranının tanen miktarını da arttırdığı ve böylelikle sindirimi düşürdüğü görülmüştür. Yem ham maddelerinde TF değerlerinin 2.75 ile 4.41 arasında olması gerektiği ve bu değer artması ile MPSE değerinin de artacağı bildirilmiştir (Blümmel ve ark., 1997). TMR' ların TF değerleri Blümmel ve ark., (1997)' nın bildirmiş olduğu değerler arasında olduğu tespit edilmiştir. Rumende mikrobiyal protein sindirim derecesi %74 ile 90 arasında değişeceği bildirilmiştir (Russell ve Rychlik, 2001). Geviş getiren hayvanlar protein gereksinimini mikrobiyal protein ile bypass proteinlerden karşılamaktadır. TMR' larda mikrobiyal protein üretiminin artmasıyla mikrobiyal protein sindiriminin de artacağı söylenebilir. Yapılan bir çalışmada yem ham maddelerinde fermente olan substrat maddelerin çoğunluğunun UYA (uçucu yağ asidi) ve gaz üretiminde kullanılması halinde mikrobiyal protein sentezi etkinliğinde düşüş gözlemleneceği bildirilmiştir (Özkan ve ark., 2020).

SONUÇ

Sonuç olarak elde edilen *in vitro* bulgulara göre 'TMR' larda akasya ağaç yapraklarının yonca kuru otu yerine ikame edilmesiyle metan üretiminde %8' lik düşüş gözlenmiştir. Mikrobiyal protein, mikrobiyal protein sentezleme etkinliği ve gerçek sindirim derecesini düşürdüğü tespit edilmiştir. Akasya yapraklarının ruminant hayvanlar için alternatif bir kaba yem kaynağı olarak kullanılmadan önce içerisinde bulunan tanenlerin sindirim derecesine ve mikrobiyal protein üretimine olumsuz etkileri düşünülmüştür. Bundan dolayı ruminant yetiştiricileri 'TMR' larda akasya ağaç yapraklarını katkı maddesi olarak kullanmaları durumunda tanenin olumsuz etkilerini azaltabileceği düşünülmektedir. *İn vitro* bulgular ile elde edilen verilerin ruminant hayvanların 'TMR' larında akasya ağaç yapraklarının etkilerinin daha net anlaşılması için *in vivo* çalışmalara ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanmış bir çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar bu makaleye eşit katkı sağlamışlardır.

Etik İzin: Bu çalışmanın yapılması etik izne ihtiyaç yoktur.

Finansal destek: Bu çalışmada finansal destek bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J. L., & Castillo, C. (2019). Redox biology in transition periods of dairy cattle: Role in the health of periparturient and neonatal animals. *Antioxidants*, 8(1), 1-20. <https://doi.org/10.3390/antiox8010020>
- Aydogdu, U., & Guzelbektes, H. (2018). Effect of colostrum composition on passive calf immunity in primiparous and multiparous dairy cows. *Veterinari Medicina*, 63(1), 1-11. <https://doi.org/10.17221/40/2017-vetmed>
- Besser, T. E., Gay, C., & Pritchett, L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(3), 419-422.

- Blum, J. W., & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66(2), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00222-0)
- Conneely, M., Berry, D., Sayers, R., Murphy, J., Lorenz, I., Doherty, M., & Kennedy, E. (2013). Factors associated with the concentration of immunoglobulin g in the colostrum of dairy cows. *Animal*, 7(11), 1824-1832. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001444>
- Erdem, H., & Atasever, S. (2005). Yeni doğan buzağılarda kolostrumun önemi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2), 79-84.
- Erkılıç, E.E., & Erdoğan, H.M. (2019). Relationship among some colostrum immune parameters and hepcidin in neonatal calves. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 4(2), 51-58. <https://doi.org/10.31797/vetbio.538251>
- Fischer-Tlustos, A., Hertogs, K., Van Niekerk, J., Nagorske, M., Haines, D., & Steele, M. (2020). Oligosaccharide concentrations in colostrum, transition milk, and mature milk of primi-and multiparous holstein cows during the first week of lactation. *Journal of dairy science*, 103(4), 3683-3695. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17357>
- Funda, E., & Serdal, K. (2021). Effect of lactation number on milk yield in holstein dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary Research*, 5(1), 1-4. <https://doi.org/10.47748/tjvr.772135>
- Genc, M., & Coban, O. (2017). Effect of some environmental factors on colostrum quality and passive immunity in brown swiss and holstein cattle. *Isr J Vet Med*, 72(3), 28-34.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Godden, S. M., Lombard, J. E., & Woolums, A. R. (2019). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 35(3), 535-556. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
- Godson, D., Acres, S., & Haines, D. (2003). Failure of passive transfer and effective colostrum management in calves. *Large Animal Veterinary Rounds*, 3(10), 1-6.
- Gökçe, E., & Erdoğan, H. (2013). Neonatal buzağılarda kolostrum immunoglobulinlerin pasif transferi. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci*, 4(1), 18-46.
- Guy, M., Mcfadden, T., Cockrell, D., & Besser, T. (1994). Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *Journal of dairy science*, 77(10), 3002-3007.
- Güngör, Ö. (2006). Newborn calves and colostrum. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(1), 103-108.
- Kara, E., & Ceylan, E. (2021). Failure of passive transfer in neonatal calves in dairy farms in ankara region. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(3), 556-565. <https://doi.org/10.3906/vet-2011-26>

- Kara, E., Terzi, O. S., Şenel, Y., & Ceylan, E. (2020).** Yerli kara ve İsviçre esmeri ırkı sığırların kolostrum kalitesinin karşılaştırılması. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* (34), 153-156.
- Kehoe, S., Heinrichs, A. J., Moody, M., Jones, C., & Long, M. (2011).** Comparison of immunoglobulin g concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. *The Professional animal scientist.* 27(3), 176-180. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30471-X](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30471-X)
- Kessler, E. C., Bruckmaier, R. M., & Gross, J. J. (2020).** Colostrum composition and immunoglobulin g content in dairy and dual-purpose cattle breeds. *Journal of animal science.* 98(8), skaa237. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa237>
- Moore, M., Tyler, J. W., Chigerwe, M., Dawes, M. E., & Middleton, J. R. (2005).** Effect of delayed colostrum collection on colostrum igg concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 226(8), 1375-1377. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1375>
- Morin, D., Constable, P., Maunsell, F., & McCoy, G. (2001).** Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science.* 84(4), 937-943. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74551-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74551-1)
- Morin, D. E., Nelson, S. V., Reid, E. D., Nagy, D. W., Dahl, G. E., & Constable, P. D. (2010).** Effect of colostrum volume, interval between calving and first milking, and photoperiod on colostrum igg concentrations in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association.* 237(4), 420-428. <https://doi.org/10.2460/javma.237.4.420>
- Mussano, F., Bartorelli Cusani, A., Brossa, A., Carossa, S., Bussolati, G., & Bussolati, B. (2014).** Presence of osteoinductive factors in bovine colostrum. *Bioscience Biotechnology, and Biochemistry.* 78(4), 662-671. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.896733>
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013).** Evaluation of the brix refractometer to estimate immunoglobulin g concentration in bovine colostrum. *Journal of dairy science.* 96(2), 1148-1155.
- Sacerdote, P., Mussano, F., Franchi, S., Panerai, A., Bussolati, G., Carossa, S., Bartorelli, A., & Bussolati, B. (2013).** Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science.* 96(3), 1745-1754. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5928>
- Sobczuk-Szul, M., Wielgosz-Groth, Z., Wronski, M., & Rzemieniewski, A. (2013).** Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of jersey and polish holstein–friesian cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences.* 37(1), 43-49. <https://doi.org/10.3906/vet-1107-42>
- Soufleri, A., Banos, G., Panousis, N., Fletouris, D., Arsenos, G., & Valergakis, G. (2019).** Genetic parameters of colostrum traits in holstein dairy cows. *Journal of dairy science.* 102(12), 11225-11232. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17054>
- Şahal, M., Terzi, O. S., Ceylan, E., & Erdal, K. (2018).** Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi.* 58(3), 41-49.
- Uzmay, C., Ayyılmaz, T., İbrahim, K., Ünlü, H. B., & Bertan, B. (2011).** Türkiye dsymb döl kontrolü projesinde çekirdek sürü islah sistemi İlkeleri uygulanarak etkinliğin artırılması olanakları konulu alt proje kapsamında aday boğa kullanımı, düvelerde doğum zorluğu ve yavrualarda gelişme özelliklerine ait ön sonuçlar. *Hayvansal Üretim.* 52(1), 1-8.
- Wilms, J., Hare, K., Fischer-Tlustos, A., Vahmani, P., Dugan, M., Leal, L., & Steele, M. (2022).** Fatty acid profile characterization in colostrum, transition milk, and mature milk of primi-and multiparous cows during the first week of lactation. *Journal of dairy science.* 105(3), 2612-2630. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20880>

Investigation of Total Colostral IgG Produced by Holstein Cows in a Lactation

Erdal KARA¹, İlknur PİR YAĞCI², Buğrahan Bekir YAĞCI¹, Taha Burak ELİFOĞLU^{2*}

¹Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, 71450, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

²Kırıkkale University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Obstetrics and Gynaecology, 71450, Yahşihan, Kırıkkale, Türkiye

ABSTRACT

Since dairy cows have greater milk production than beef cows, because of the dilution of Immunoglobulin G (IgG) colostrum of dairy cows assumed to be of poorer quality compared with beef cows. The objective of the present study was to investigate quality of colostrum and total IgG produced in a lactation by Holstein cows (n=80). The average colostrum volume at the first seven milking were measured as 5.42 L, 6.73 L, 8.55 L, 9.26 L, 8.44 L, 9 L, 10.01 L respectively. The average total colostrum produced by cows in the first 3 days period was calculated as 57.41 L. The average colostrum IgG concentration were calculated as 90.81 mg/mL, 68.67 mg/mL, 58.40 mg/mL, 37.33 mg/mL, 15.22 mg/mL, 10.7 mg/mL, 5.9 mg/mL respectively for each milking. In conclusion, enough colostrum and IgG are produced in the first 3 days in Holstein cows for calf feeding. In addition to this, there is huge opportunity that excessive amount of IgG and colostrum could be processed for other by-products.

Keywords: Colostrum, Dairy cow, Holstein, IgG, Mass.

Holştayn İneklerde Bir Laktasyonda Üretilen Toplam Kolostral IgG'nin

Araştırılması

ÖZ

Süt ineklerinin süt üretimi besi ineklerinden daha fazla olduğundan, süt ineklerinin kolostrumunun seyrelmesi nedeniyle besi ineklerine göre daha düşük kalitede olduğu varsayılır. Bu çalışmanın amacı, Holstein ineklerinde (n=80) bir laktasyonda üretilen kolostrumun kalitesi ve toplam immunoglobulin G (IgG) miktarının araştırılmasıdır. İlk 7 sağımdaki kolostrum hacimleri sırasıyla 5.42 L, 6.73 L, 8.55 L, 9.26 L, 8.44 L, 9 L, 10.01 L olarak ölçüldü. İneklerin ilk 3 günlük dönemde ürettikleri ortalama toplam kolostrum 57.41L olarak hesaplanmıştır. Ortalama kolostrum IgG konsantrasyonu her sağım için sırasıyla 90.81 mg/mL, 68.67 mg/mL, 58.40 mg/mL, 37.33 mg/mL, 15.22 mg/mL, 10.70 mg/mL, 5.9 mg/mL olarak hesaplandı. Sonuç olarak Holstein ineklerde buzağı beslenmesi için ilk 3 günde yeterli miktarda kolostrum ve IgG üretilmektedir. Buna ek olarak, artan IgG ve kolostrumun diğer yan ürünler için işlenmesi mümkündür.

Anahtar Kelimeler: Holstein, IgG, Kolostrum, Kütle, Süt ineği

To cite this article: Kara E, Pir Yağcı İ, Yağcı BB, Elifoglu TB. Investigation of Total Colostral IgG Produced by Holstein Cows in a Lactation. (2023):16(2): 234-240

Submission: 19.01.2023 Accepted: 01.06.2023 Published Online: 14.06.2023

ORCID ID; EK: 0000-0001-7047-9502 İPY: 0000-0002-4470-8639 BBY: 0000-0002-7473-3579 TBE: 0000-0002-2302-6321

*Corresponding author e-mail: ibelifoglu@kku.edu.tr

INTRODUCTION

Colostrum is the secretion, which is secreted from the mammary gland after birth, which has a very different structure from normal milk. Although colostrum is very different in color, taste, consistency and odor from normal milk, the greatest difference is seen in its composition (Godson et al. 2003). This different composition of colostrum changes rapidly and turns into normal milk after a while. Because of this change, it is called colostrum for the first 48 h, while it is called transitional milk (trans-milk) between 48-72 h and is considered normal milk after 72 h (Erdem and Atasever 2005). To promote health of the newborn dairy calf, colostrum that is nutrient-dense and contains immune factors is essential (Blum and Hammon 2000, Godden 2008, Fischer-Tlustos et al. 2020).

High concentrations of immunoglobulin G (IgG) and bioactive compounds are available in colostrum compared with normal milk (Blum and Hammon 2000). Timely supply with high quality colostrum could ensure a sufficient passive transfer (Besser et al. 1991). Since dairy cows have greater milk production than beef cows, because of the dilution of IgG colostrum of dairy cows assumed to be of poorer quality compared with beef cows (Kessler et al. 2020). There are few studies which are related with IgG composition and concentration of colostrum in dairy cows (Guy et al. 1994, Morin et al. 2001, Moore et al. 2005). In last 25 years, with the help of successful genetic selection milk yield per cow has been increased about times (Abuelo et al. 2019, Funda and Serdal 2021). So, it supposed to be more diluted and lower IgG concentrations of colostrum in a lactation. In this context, the objective of the present study was to investigate quality of colostrum and total IgG produced in a lactation by Holstein cows.

MATERIAL and METHODS

Ethical Statement

This study was approved by the Kirikkale University Animal Experiments Local Ethics Committee (Approval no: 2020/23).

Animal Material

The presented study was carried out in a commercial dairy farm which is free from herd diseases (brucellosis and tuberculosis) and had 11.5 tons milk yield per lactation. Preventive medicine and vaccination programs are followed, and milking is done 3 times a day with a computerized milking system. Animals included in the presented study consisted of 80 multiparous Holstein cows which gave at least one birth and under the age of five with body condition score ranging between 2,5 – 3 over 5 scale. All cows were housed in similar conditions and fed by the appropriate nutrition program for the period and received the same dry period treatment. Clinical examinations were performed to evaluate general condition and udder health of the animals. Animals who had signs like fever, weight loss, lethargy and loss of appetite considered as sick and excluded from the study. All udders of the cows were examined visually and by palpation for common mastitis signs like redness, pain, swelling and heat. Cows included in the study were observed closely before, during and after birth. Animals who had difficult birth were excluded from the study. In addition, physical examination of colostrum was performed and, samples who had flakey, clotty and abnormal colostrum were excluded from the study.

Sample Collection

Delivery rooms were under 24-h observation, and after delivery single milking machines were provided and within 1 h after the birth first colostrum samples were collected. The following milking were performed every 12 h. Within the scope of the study, colostrum samples were collected from 7 milking for 3 days. All collected samples were stored at -20°C until analyses performed.

Analyses

Colostrum volumes were obtained by manually measuring the colostrum milked into separate chambers with single milking machines at each milking. Colostrum volume measurement was made with measuring cups. Liters were measured with 10-liter containers adjusted to 250 mL precision, and the mL measurement giving the fraction was measured with 1 liter measuring tapes with 100 mL precision. The results obtained were recorded as multiples of 250 mL and were standardized by rounding up or down.

Analyses were performed using a commercial enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Bovine Immunoglobulin ELISA kit, Bio-X Diagnostics, Rochefort, Belgium). According to

commercial kit test procedure colostrum samples were diluted 1/1000 and analyses were performed according to the kit manual. The mass of IgG was calculated by the results obtained data from ELISA method used. The results obtained in mg/dL were converted to g/L units, and the mass was obtained by multiplying the volume and density.

RESULTS

The average colostrum volume at the 1st, 2nd, 3rd, 4th, 5th, 6th and 7th were measured as 5.42 L, 6.73 L, 8.55 L, 9.26 L, 8.44 L, 9 L, 10.01 L respectively. The average total colostrum produced by cows in the first 3 days period was calculated as 57.41L. The average colostrum IgG concentration were calculated as 90.81 mg/mL, 68.67 mg/mL, 58.40 mg/mL, 37.33 mg/mL, 15.22 mg/mL, 10.70 mg/mL, 5.90 mg/mL respectively for each milking. Total colostrum IgG concentration was calculated as 36.29 mg/mL. At each milking, average IgG mass were measured as 492.19 g, 462.15 g, 499.32 g, 345.67 g, 128.45 g, 96.30 g, and 59.05 g respectively. Total colostrum IgG mass obtained in the first 7 milking were calculated as 2083.09 g (*Table 1*).

Table 1. Average volume, IgG density and IgG mass of the milk obtained in the first 7 milking separately for each milking

Milking	1	2	3	4	5	6	7	Total
Average Volumes (Liters)	5.42	6.73	8.55	9.26	8.44	9.00	10.01	57.41
Average IgG Concentrations (g/L)	90.81	68.67	58.40	37.33	15.22	10.70	5.90	36.28
Average IgG mass (Gram)	492.19	462.15	499.32	345.67	128.45	96.30	59.05	2083.09

DISCUSSION

In the presented study, the average colostrum volume obtained at the first milking was calculated as 5.42L. The volume of colostrum obtained at the first milking for Holstein cattle was reported as 6.4L (Kehoe et al. 2011) and 9.5 L(Quigley et al. 2013) at different studies. Different studies show that average colostrum weight at the first milking for Holstein cow is between 5.9 kg and 6.7 kg (Soufleri et al. 2019, Conneely et al. 2013, Fischer-Tlustos et al. 2020). Colostrum density in Holstein cattle is 1.056 g/cm³ (Sobczuk-Szul et al. 2013). Considering that the colostrum density is very close to 1 g/cm³, it is possible to compare the studies in which colostrum is evaluated by mass and volume. In the presented study, at the first milking, colostrum amount measured were lower than the results of (Quigley et al. 2013), but similar to those of other researchers' results. (Soufleri et al. 2019, Conneely et al. 2013, Fischer-Tlustos et al. 2020).

In this study, colostrum IgG concentrations of the first 7 milkings (0 - 72 h period, 12 h intervals) were evaluated as, 90.81 mg/mL, 68.67 mg/mL, 58.40 mg/mL, 37.33mg/mL, 15.22 mg/mL, 10.70 mg/mL and 5.9 mg/mL respectively. Researchers reported IgG concentrations in the colostrum of Simmental cattle as 62.82 mg/mL, 41.18 mg/mL and 17.33 mg/mL on days 0, 1 and 3, respectively (Erkiliç and Erdoğan 2019). In a different study with Holstein cows, starting from the first milking, 94.1 mg/mL, 39.3 mg/mL at the 2nd milking, 13.9 mg/mL at the 3rd milking, 6.1 mg/mL at the 4th milking, 3.4 mg/mL at the 5th milking, 2.6 mg/mL in 6th milking (Fischer-Tlustos et al. 2020). Although the first milking colostrums of this study were higher than

Erkiliç and Erdoğan (2019), the 3rd day measurements were found to be lower, and the IgG decrease was faster. Although it is very similar to the first milking density of Fischer-Tlustos et al. (2020), the decrease in IgG density in the present study

was slower. It is thought that the difference between these studies may be due to the different breeds, which is known to have a direct effect on colostrum quality (Kara et al. 2020).

Colostrum quality in cattle varies between 1-200 mg/mL (Gökçe and Erdoğan 2013). Considering the colostrum studies in Holstein cattle, the colostrum IgG densities obtained in the first milking varies. Different researchers reported between 79.51 mg/mL and 117.45 mg/mL (Genc and Coban 2017, Kara and Ceylan 2021, Aydogdu and Guzelbektes 2018). At the first milking, IgG density of the present study is 90.81 mg/mL which is compatible with previous studies.

The density of the colostrum is the highest at first milking which is compatible with the definition (Wilms et al. 2022). In addition to this, where the IgG density decreases by more than 50% compared to the previous milking was 5th milking and IgG concentration reaches down to mature milk composition at 7th milking. Secretion at mammary gland 48 h after birth is called as colostrum, 48 – 72 h as transitional milk and after 72 h called as mature milk (Erdem and Atasever 2005). In this context, decrease in IgG concentration in 7 milking are compatible with previous studies.

The colostrum IgG mass was obtained by multiplying the colostrum volume obtained for each milking with its density. Kehoe et al. (2011) found the IgG mass obtained in the first milking between 532.8 g and 690 g for cows in different lactations and

revealed that the colostral IgG mass increased with increasing lactation number. In the present study, 492.19 g of IgG was obtained in the first milking. Average colostrum volumes were quite similar in the two studies. However, in another study (Morin et al. 2010) that the amount of colostrum was higher than the present study, but the IgG density and mass were reported lower. Even though all 3 compared studies were conducted on Holstein cows, the results obtained may differ considerably.

A similar study was conducted by Fischer-Tlustos et al. (2020) as obtaining colostrum amount and concentration. They reported IgG masses as 555.19 g, 302.61 g, 134.83 g, 75.03 g, 47.26 g, 34.84 g in first 6 milking respectively and 1149.76 g in total. In the present study it was evaluated as 492.19 g, 462.15 g, 499.32 g, 345.67 g, 128.45 g, 96.3 g respectively in same order and 2024.04 g totally. The colostral IgG mass obtained in the first 6 milking was found to be 76.04% more than the Fischer-Tlustos et al. (2020) reported. It was thought that this difference is because the colostrum IgG density decreases very rapidly in the second and subsequent milking in the mentioned study (Fischer-Tlustos et al. 2020), whereas it decreases very slowly in the first 4 milking in the present study.

In this study, it is aimed to calculate the IgG mass produced by the Holstein cows which is one of the most common dairy cattle in the world, in one lactation to understand how much of this produced colostrum amount can be used except of calf feeding and which milking can be used as raw materials to obtain colostrum derived products. Colostrum has an indispensable place in the lives of calves born without an immune system (Gökçe and Erdoğan 2013). It is recommended to give colostrum up to 10-12% of their body weight within the first 4 h of birth (Godden et al. 2019). When the birth weight of the Holstein calves in the study is taken as reference, an average of 40 kg and 4 L colostrum need arise

(Godden et al. 2019, Uzmay et al. 2011). If this 4 L need will be met from the first milking since it is required in the first 4 h, it is seen in the presented study that the average colostrum volume obtained at the first milking is 5.42 L and only 1.42 L of colostrum has increased since the first milking. In the following feedings, 2-2.5 L colostrum is fed every 12 h (Güngör 2006). In the light of this knowledge, according to the data obtained in the present study, 4.23 L, 6.05 L, 7.76 L, 5.94 L, 6.5L and 7.51 L of colostrum and trans-milk is available for industrial use other than calve feeding respectively in the following milking. These excess colostrum and trans-milk could be used in colostrum replacement feeds, or it can be used as a source for obtaining other molecules due to its rich composition. For instance, bovine colostrum contains 5-10 times more IgG than blood sera. In addition to this, bovine colostrum has a content of 40 times more intense than human colostrum (Şahal et al. 2018). Various components other than Ig from colostrum can also be purified and used by using various biotechnological methods (Sacerdote et al. 2013, Mussano et al. 2014).

CONCLUSIONS

In conclusion, enough colostrum and IgG are produced in the first 3 days in Holstein cows for calf feeding. In addition to this, there is huge opportunity that excessive amount of IgG and colostrum could be processed for other by-products.

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

Author Contribution Rates: The authors declared that they contributed equally to the article.

Ethical Statement: This study was approved by the Kırıkkale University Animal Experiments Local Ethics Committee (Approval no: 2020/23).

Financial Support: This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Kırıkkale University. Project number 2021/041.

REFERENCES

- Abuelo, A., Hernández, J., Benedito, J. L., & Castillo, C. (2019). Redox biology in transition periods of dairy cattle: Role in the health of periparturient and neonatal animals. *Antioxidants*, 8(1), 1-20. <https://doi.org/10.3390/antiox8010020>
- Aydogdu, U., & Guzelbektes, H. (2018). Effect of colostrum composition on passive calf immunity in primiparous and multiparous dairy cows. *Veterinari Medicina*, 63(1), 1-11. <https://doi.org/10.17221/40/2017-vetmed>
- Besser, T. E., Gay, C., & Pritchett, L. (1991). Comparison of three methods of feeding colostrum to dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 198(3), 419-422.
- Blum, J. W., & Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livestock Production Science*, 66(2), 151-159. [https://doi.org/10.1016/S0301-6226\(00\)00222-0](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(00)00222-0)
- Conneely, M., Berry, D., Sayers, R., Murphy, J., Lorenz, I., Doherty, M., & Kennedy, E. (2013). Factors associated with the concentration of immunoglobulin g in the colostrum of dairy cows. *Animal*, 7(11), 1824-1832. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001444>
- Erdem, H., & Atasever, S. (2005). Yeni doğan buzağılarda kolostrumun önemi. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 20(2), 79-84.
- Erkiliç, E.E., & Erdoğan, H.M. (2019). Relationship among some colostrum immune parameters and hepcidin in neonatal calves. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 4(2), 51-58. <https://doi.org/10.31797/vetbio.538251>
- Fischer-Tlustos, A., Hertogs, K., Van Niekerk, J., Nagorske, M., Haines, D., & Steele, M. (2020). Oligosaccharide concentrations in colostrum, transition milk, and mature milk of primi-and multiparous holstein cows during the first week of lactation. *Journal of dairy science*, 103(4), 3683-3695. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17357>
- Funda, E., & Serdal, K. (2021). Effect of lactation number on milk yield in holstein dairy cows. *Turkish Journal of Veterinary Research*, 5(1), 1-4. <https://doi.org/10.47748/tjvr.772135>
- Genc, M., & Coban, O. (2017). Effect of some environmental factors on colostrum quality and passive immunity in brown swiss and holstein cattle. *Isr J Vet Med*, 72(3), 28-34.
- Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24(1), 19-39. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2007.10.005>
- Godden, S. M., Lombard, J. E., & Woolums, A. R. (2019). Colostrum management for dairy calves. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 35(3), 535-556. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2019.07.005>
- Godson, D., Acres, S., & Haines, D. (2003). Failure of passive transfer and effective colostrum management in calves. *Large Animal Veterinary Rounds*, 3(10), 1-6.
- Gökçe, E., & Erdoğan, H. (2013). Neonatal buzağılarda kolostrum immunoglobulinlerin pasif transferi. *Turkiye Klinikleri J Vet Sci*, 4(1), 18-46.
- Guy, M., Mcfadden, T., Cockrell, D., & Besser, T. (1994). Regulation of colostrum formation in beef and dairy cows. *Journal of dairy science*, 77(10), 3002-3007.
- Güngör, Ö. (2006). Newborn calves and colostrum. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(1), 103-108.
- Kara, E., & Ceylan, E. (2021). Failure of passive transfer in neonatal calves in dairy farms in ankara region. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 45(3), 556-565. <https://doi.org/10.3906/vet-2011-26>
- Kara, E., Terzi, O. S., Şenel, Y., & Ceylan, E. (2020). Yerli kara ve İsviçre esmeri ırkı sığırların kolostrum kalitesinin karşılaştırılması. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.* (34), 153-156.
- Kehoe, S., Heinrichs, A. J., Moody, M., Jones, C., & Long, M. (2011). Comparison of immunoglobulin g concentrations in primiparous and multiparous bovine colostrum. *The Professional animal scientist*, 27(3), 176-180. [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)30471-X](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)30471-X)
- Kessler, E. C., Bruckmaier, R. M., & Gross, J. J. (2020). Colostrum composition and immunoglobulin g content in dairy and dual-purpose cattle breeds. *Journal of animal science*, 98(8), skaa237. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa237>
- Moore, M., Tyler, J. W., Chigerwe, M., Dawes, M. E., & Middleton, J. R. (2005). Effect of delayed colostrum collection on colostrum igg concentration in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(8), 1375-1377. <https://doi.org/10.2460/javma.2005.226.1375>
- Morin, D., Constable, P., Maunsell, F., & McCoy, G. (2001). Factors associated with colostrum specific gravity in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 84(4), 937-943. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74551-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74551-1)
- Morin, D. E., Nelson, S. V., Reid, E. D., Nagy, D. W., Dahl, G. E., & Constable, P. D. (2010). Effect of colostrum volume, interval between calving and first milking, and photoperiod on colostrum igg concentrations in dairy cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 237(4), 420-428. <https://doi.org/10.2460/javma.237.4.420>
- Mussano, F., Bartorelli Cusani, A., Brossa, A., Carossa, S., Bussolati, G., & Bussolati, B. (2014). Presence of osteoinductive factors in bovine colostrum. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 78(4), 662-671. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.896733>
- Quigley, J. D., Lago, A., Chapman, C., Erickson, P., & Polo, J. (2013). Evaluation of the brix refractometer to estimate immunoglobulin g concentration in bovine colostrum. *Journal of dairy science*, 96(2), 1148-1155.
- Sacerdote, P., Mussano, F., Franchi, S., Panerai, A., Bussolati, G., Carossa, S., Bartorelli, A., & Bussolati, B. (2013). Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *Journal of Dairy Science*, 96(3), 1745-1754. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5928>
- Sobczuk-Szul, M., Wielgosz-Groth, Z., Wronski, M., & Rzemieniewski, A. (2013). Changes in the bioactive protein concentrations in the bovine colostrum of jersey and polish holstein-friesian cows. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 37(1), 43-49. <https://doi.org/10.3906/vet-1107-42>
- Soufleri, A., Banos, G., Panousis, N., Fletouris, D., Arsenos, G., & Valergakis, G. (2019). Genetic parameters of colostrum traits in holstein dairy cows. *Journal of dairy science*, 102(12), 11225-11232. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17054>
- Şahal, M., Terzi, O. S., Ceylan, E., & Erdal, K. (2018). Buzağı ishalleri ve korunma yöntemleri. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 58(3), 41-49.

- Uzmay, C., Ayyılmaz, T., İbrahim, K., Ünlü, H. B., & Bertan, B. (2011).** Türkiye dsymb döl kontrolü projesinde çekirdek sürü islah sistemi İlkeleri uygulanarak etkinliğin artırılması olanakları konulu alt proje kapsamında aday boğa kullanımı, düvelerde doğum zorluğu ve yavrularda gelişme özelliklerine ait ön sonuçlar. *Hayvansal Üretim*. 52(1), 1-8.
- Wilms, J., Hare, K., Fischer-Tlustos, A., Vahmani, P., Dugan, M., Leal, L., & Steele, M. (2022).** Fatty acid profile characterization in colostrum, transition milk, and mature milk of primi-and multiparous cows during the first week of lactation. *Journal of dairy science*. 105(3), 2612-2630. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-20880>

The Efficiency of 7.2% Hypertonic Saline Solution on Echocardiographic Parameters in a Dog with Systemic Inflammatory Response Syndrome

Nilay ARSLAN^{1*}, Cansu BALIKÇI¹, Songül ERDOĞAN¹, Hasan ERDOĞAN¹, Kerem URAL¹

¹Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary, Aydın Adnan Menderes University, 09000, Aydın, Türkiye

ABSTRACT

We were aimed with this case report that evaluate the efficiency of 7.2% hypertonic saline infusion on echocardiographic parameters in a 5-months-old male Kangal Shepherd crossbreed dog with the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). For this propose on initial referral to the clinic, SIRS was defined with clinical and laboratory finding. Hypertonic saline (7.2%) was administered at intravenously of 4 ml.kg⁻¹ (1.6 ml.kg⁻¹.min⁻¹) for fluid replacement. Echocardiography was performed at before (t=0 min), and after (t=5, t=15 min) fluid infusion. An increase in systolic function, cardiac contractility and left ventricular preload in the dog were determineted with the administration of 7.2% hypertonic saline. Considering this case, systolic dysfunction was improved by infusion of 4 ml.kg⁻¹ 7.2% hypertonic saline solution.

Key Words: Hypertonic Saline Solution, Left Ventricular Function, M-Mode Echocardiography, Systemic Inflammatory Response Syndrome

Sistemik Yangısal Yanıt Sendromlu Bir Köpekte %7.2'lik Hipertonik Salin Solüsyonunun Ekokardiyografik Parametreler Üzerine Etkisi

ÖZ

Biz bu olgu sunumuyla sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişmiş 5 aylık, erkek, Kangal Çoban melezi bir köpekte %7.2 hipertonik salin infüzyonunun ekokardiyografik parametreler üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçladık. Bu kapsamda olgu kliniğe ilk başvurduğunda SIRS klinik ve laboratuvar bulguları ile tanımlandı. Sıvı replasmanı için %7.2 hipertonik salin, 4 ml.kg⁻¹ dozda (1.6 ml.kg⁻¹.dk⁻¹) intravenöz yolla uygulandı. Ekokardiyografi sıvı infüzyonundan önce (t=0. dk), ve sonra (t=5., t=15. dk) gerçekleştirildi. Köpekte %7.2'lik hipertonik salin uygulaması sonrasında sistolik fonksiyonda, kardiyak kontraktilitede ve sol ventrikül ön yükünde artış belirlendi. Bu olgu dikkate alındığında 4 ml.kg⁻¹ %7.2 hipertonik salin solüsyonu infüzyonun sistolik disfonksiyonu düzenlediği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Hipertonik Salin Solüsyon, Sol Ventrikül Fonksiyonu, M-Mod Ekokardiyografi, Sistemik Inflamatuvar Yanıt Sendromu

To cite this article: Arslan N, Balıkçı C, Erdoğan S, Erdoğan H, Ural K. The Efficiency of 7.2% Hypertonic Saline Solution on Echocardiographic Parameters in A Dog with Systemic Inflammatory Response Syndrome. (2023) 16(2):241-247

Submission: 20.12.2022 Accepted: 01.06.2023 Published Online: 05.06.2023

ORCID ID; NA: 0000-0003-0487-9086, CB: 0000-0002-6261-162X, SE: 0000-0002-7833-5519, HE: 0000-0001-5141-5108, KU: 0000-0003-1867-7143. *Corresponding author e-mail: arslanilay123@gmail.com

INTRODUCTION

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) is a clinical symptom complex of noninfectious (pancreatitis, trauma, neoplasia and immune-mediated diseases) or infectious origin which is initiated by series of inflammatory events (Bone et al. 1992, Rau et al. 2007, Torrente et al. 2015). Even if SIRS exist, excessive amount of cytokine is released followed by activation of the coagulation system throughly increasing microvascular permeability in relation with progressive endothelial dysfunction (Dircks et al. 2012, Bauer and Moritz 2013). All aforementioned could contribute to secondary multiple organ dysfunction and death (Bone et al. 1992, Shapiro et al. 2010). Furthermore, it was demonstrated that vast majority of researches claimed that myocardial dysfunction might be existing during SIRS (Nelson and Thompson 2006, Gommeren et al. 2012, Hamacher et al. 2015). In patients with sepsis and SIRS, impaired perfusion, nutrition and along with metabolism, could lead to a general increase in microvascular permeability which can cause hypovolemia and tissue edema as a result of transcapillary leakage (Hinshaw 1996, Fink 2001).

The diagnosis of SIRS was made in regard to criteria previously stated (Bone et al. 1992, Okano et al. 2002). Left ventricular systolic function, related ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) have been evaluated by echocardiography in dogs with SIRS prone to myocardial dysfunction (Nelson and Thompson 2006, Gommeren et al. 2012).

Hypovolemic shock has been successfully managed with 7.2% hypertonic saline solution (HSs) (Velasco et al. 1980, Lopes et al. 1981, Us et al. 2001). It has a beneficial hemodynamic effect with various mechanism, that consequently elevates microvascular blood flow, on initial treatment of severe hypovolemia and shock (Baue et al. 1967, Drobin and Hahn 2002, Suzuki et al. 2005). Although the cardiovascular effect of 7.2% HSs has been investigated in normovolemic (Suzuki et al. 2006) and anesthetized dogs (Suzuki et al. 2008), we were unaware of finding documented reports of cardiac acceleration effect of HSs infusion in hypovolemic dogs with SIRS.

Thus, the aim of this case report was to determine the efficiency of 7.2% HSs infusion on echocardiographic parameters in a dog with SIRS.

Case Report

Case Presentation and Hypertonic Saline Infusion

A 5-months-old male Kangal Shepherd crossbreed dog presented as an critical case and priority triage referral to Aydın Adnan Menderes University, Small Animal Hospital. History of the dog was included acute diarrhea and vomiting for 3 months, two weeks after antihelminthic therapy of tremors begins and which was followed by anorexia, vomiting, diarrhea and constipation were evident. Muscle weakness with weight loss, comatose mentation, RR of 60 bpm, a HR of 165 bpm, and 34.5 °C body temperature, prolonged capillary refill time (3 s) were obtained in physical examination. There was a poor and insensible femoral pulse. For supportive care, 4 ml.kg⁻¹ 7.2% HSs intravenously was infused at a flow rate of 1.6 ml.kg⁻¹.min⁻¹. Echocardiography was performed at before (t=0 min), and after (t=5, t=15 min) fluid infusion.

Echocardiography

In order to perform the echocardiographic examination, the right 4-6 intercostal space of the dog was shaved and alcohol was administered first. Echocardiographic evaluation was performed using a 3.5-4 MHz convex probe and ultrasound gel on the echocardiography table with the device (Mindray M5 Color Doppler, distributed by Hasvet, Antalya, Turkey) available as a facility in our faculty. In echocardiographic evaluation, right parasternal short axis view; left ventricle (LV) were observed at the level of the chordae tendineae, and related parameters were measured with using the M-mod and Teicholz method (Figure 1). Left atrium-Aorta (LA/Ao) measurements were performed at the base of the heart (Figure 2). Echocardiographic images were obtained at before (t=0 min), and after (t=5, t=15 min) 7.2% HSs infusion and these are shown in Table 1.

Table 1. Echocardiographic measurements at 0, 5 and 15 minutes of administration of hypertonic solution.

Measurements	0	5	15
IVSd	0.62 cm	0.62 cm	0.7 cm
LVIDd	1.86 cm	2.37 cm	2.43 cm
LVPWd	0.85 cm	0.45 cm	0.45 cm
IVSs	0.85 cm	1.02 cm	0.85 cm
LVIDs	0.96 cm	1.07 cm	1.19 cm
LVPWs	1.07 cm	0.85 cm	0.9 cm
EDV	10.62 ml	19.65 ml	20.75 ml
ESV	1.84 ml	2.49 ml	3.25 ml
SV	8.78 ml	17.08 ml	17.50 ml
EF%	82.7	87.3	84.3
FS%	48.5	54.8	51.2
LA/Ao	0.77	0.86 cm	0.99 cm
LA	1.36 cm	1.50 cm	1.63 cm
Ao	1.76 cm	1.71 cm	1.64 cm
HR	165	103	99
CO	1448,7 ml	1759,24	1732,5

IVSd= Interventricular septum diastolic, LVIDd= Left ventricular internal diameter, LVPWd= Left ventricular posterior wall diastolic, IVSs= Interventricular septum systolic, LVIDs= Left ventricular internal diameter systolic, LVPWs= Left ventricular posterior Wall systolic, EDV= End diastolic volume, ESV= End systolic volume, SV= Stroke volume, EF%= Left ventricular ejection fraction, FS% = Left ventricular fractional shortening, LA/Ao= Left atrium/aortic root, LA= Left atrium, Ao= Aortic root, HR= Heart rate, CO= Cardiac output.CO

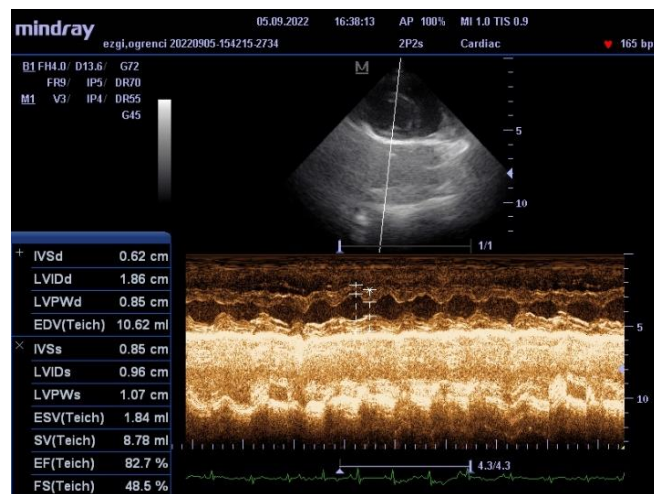


Figure1. LV measurements at the corda tendinea level in the right parasternal short axis.

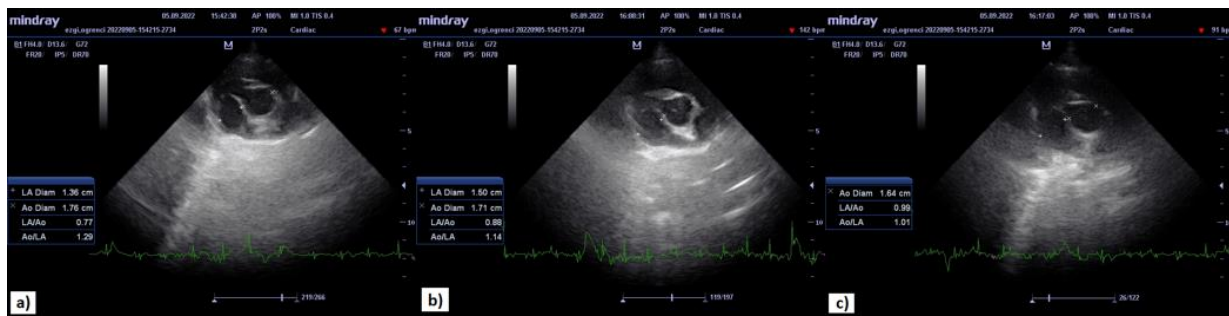


Figure 2. Right parasternal axis-heart base image LA/Ao measurements at t=0 (a), t=5 (b), t=15 (c) min after the initiation of 7.2% hypertonic saline solution infusion.

DISCUSSION

In this case report we aimed to evaluate the efficiency of 7.2% HSs infusion on echocardiographic parameters in dog with SIRS. We determined that systolic dysfunction was improved by infusion of 4 ml.kg⁻¹ 7.2% HSs.

There are a few studies related to echocardiographic evaluation following 7.2% HSs in animals. These studies stated that HSs infusions had no effect on systolic function however they performed on normovolemic animals (Cosntable et al. 1994, Ogino et al. 1998, Suzuki et al. 2006). Echocardiography is a crucial non-invasive assessment tool for the diagnosis and follow-up of the shocked patient. It is enable to evaluate intravascular volume that is difficultly determined by only clinical examination in patient with circulatory failure (McLean 2016).

Regarding previous study performed by Sirieix et al. (1999), investigated postoperative role of hypertonic solution on volume resuscitation in patient with mitral valve disorders, the researchers found that EF values increased after the HSs. It was reported that EF slightly increased after infusion of HSs in the normovolemic dogs (Suzuki et al. 2006). Magalhães et al. (2019), also showed left ventricular systolic dysfunction and myocardial injury were improved in brain death rats with HSs. Considering our results as EF increased from 82.7% (before infusion) to 87.3% (at 5 min) and thereafter were stable as 84.3% (at 15 min after completion of infusion), the amelioration of EF might be associated with effect on left ventricular preload/afterload and increasing myocardial contractility (Goertz et al. 1995, Sirieix et al. 1999).

Stroke volume (SV) and end-diastolic volume (EDV) regularly increased from at the time 5 and 15 min to 17.08 ml, 19.65 ml and 17.50 ml, 20.75 ml respectively, compared with prior to infusion (8.78

ml, 10,62 respectively). Furthermore LVIDd and LVIDs regularly increased from 1.86 to 2.43 and 0.96 to 1.19 cm at timeline 0. and 15. th minutes. According to Tavanaeimanesh et al. (2015), SV, end-diastolic volume (EDV) and LVIDd/s peaked at 40 min and relevant alteration were no more presented markedly in contrast to basal volume through 1.5 hours following infusion.

According to Campbell and Kittleson (2007), the La/Ao ratio is important for correct assessment of LA by eliminating racial body size differences. Furthermore these researchers showed a decrease in the LA/Ao ratio and LA value due to hypovolemia in cats, and an increase in the LA/Ao ratio and LA value after the hypovolemia was ameliorated with fluid infusion. In a human study (Agarwal et al. 2011) in which hypovolemia was induced by ultrafiltration, the LA diameter was initially measured as 2.1 cm in which was calculated as 0.14 and 0.15 cm lesser than the baseline values at 4 and 8 weeks, respectively. In several studies, LA diameter in human patients were increased after rapid intravenous fluid management (Di Donato et al. 1982, Duvokot et al. 1994) In our study, we determined that there was a gradual increase in LA/Ao ratio from 0.77 to 0.99 and LA value from 1.36 to 1.63 after HSs infusion. The reason for the elevation in LA diameter and LA/Ao ratio could be caused by the response to high LV diastolic filling pressure from myocardial failure (Fox et al. 1995, Rush et al. 2002). Heart rate and over volume loading may impact on LA diameter (DeMaria et al. 1979, Di Donato et al. 1982).

Experimentally induced hypovolemic shock in dogs has been resuscitated successfully with small volume of 7.2% HSs (Velasco et al. 1980, Lopes et al. 1981, Us et al. 2001). Hypertonic saline (7.2%) solution's beneficial hemodynamic effects are temporarily reducing systemic and pulmonary

vascular resistance (Suzuki et al. 2005), rapid increase of plasma volume with shifting body fluid from the intracellular space (Baue et al. 1967, Drobin and Hahn 2002), eliciting a vagal-mediated reflex by simulation of pulmonary osmoreceptors (Lopes et al. 1981, Velasco et al. 2004), and increasing cardiac contractility (Velasco et al. 1980). Additionally, a positive inotropic effect was determined with infusion (Kien and Kramer 1989, Muir and Sally 1989, Kien et al. 1991, Mouren et al. 1995). It caused cellular fluid loss via the osmotic effect, so elevating the calcium level (Wildenthal et al. 1975). Positive inotropic effect of 7.2% HSs may be related to increase cardiac contractility due to elevated intracellular calcium level. Nevertheless, considering in vitro investigation, a rapid elevation of extracellular sodium concentration causes a negative inotropic effect on cardiac contractility, lasting up to 10 minutes (Brown et al. 1990, Ben-Haim et al. 1992, Waagstein et al. 1999). A significant positive effect was not identified on some reports, so improvement of cardiac contractility is still considered uncertain (Suzuki et al. 2006).

In conclusion, we determined an increase in systolic function, cardiac contractility and left ventricular preload with the administration of 7.2% HSs in a dog with SIRS.

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

Authors Contribution Rate: The authors declared that they contributed equally to the article.

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

Financial Support: No financial support was received for this study.

REFERENCES

Agarwal, R., Bouldin, J. M., Light, R. P., & Garg, A. (2011). Inferior vena cava diameter and left atrial diameter measure volume but not dry weight. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 6(5), 1066–1072. <https://doi.org/10.2215/CJN.09321010>

Baue, A. E., Tragus, E. T., & Parkins, W. M. (1967). A comparison of isotonic and hypertonic solutions and blood on blood flow and oxygen consumption in the

initial treatment of hemorrhagic shock. *The Journal of trauma*, 7(5), 743–756. <https://doi.org/10.1097/00005373-196709000-00012>

Bauer, N., & Moritz, A. (2013). Coagulation response in dogs with and without systemic inflammatory response syndrome - preliminary results. *Research in veterinary science*, 94(1), 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.07.029>

Ben-Haim, S. A., Edoute, Y., Hayam, G., & Better, O. S. (1992). Sodium modulates inotropic response to hyperosmolarity in isolated working rat heart. *The American journal of physiology*, 263(4 Pt 2), H1154–H1160. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1992.263.4.H1154>

Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest*, 101(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>

Brown, J. M., Grosso, M. A., & Moore, E. E. (1990). Hypertonic saline and dextran: impact on cardiac function in the isolated rat heart. *The Journal of trauma*, 30(6), 646–651.

Campbell, F. E., & Kittleson, M. D. (2007). The effect of hydration status on the echocardiographic measurements of normal cats. *Journal of veterinary internal medicine*, 21(5), 1008–1015. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2007\)21\[1008:teohso\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2007)21[1008:teohso]2.0.co;2)

Constable, P. D., Muir, W. W., 3rd, & Binkley, P. F. (1994). Hypertonic saline is a negative inotropic agent in normovolumic dogs. *The American journal of physiology*, 267(2 Pt 2), H667–H677. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1994.267.2.H667>

DeMaria, A. N., Neumann, A., Schubart, P. J., Lee, G., & Mason, D. T. (1979). Systematic correlation of cardiac chamber size and ventricular performance determined with echocardiography and alterations in heart rate in normal persons. *The American journal of cardiology*, 43(1), 1–9. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(79\)90036-5](https://doi.org/10.1016/0002-9149(79)90036-5)

Di Donato, M., Mori, F., Barletta, G., Dabizzi, R. P., & Fantini, F. (1982). Effect of dextran infusion on left atrial size in normal subjects. *Cardiology*, 69(5), 257–264. <https://doi.org/10.1159/000173514>

Dircks, B. H., Mischke, R., & Schuberth, H. J. (2012). Platelet-neutrophil aggregate formation in blood samples from dogs with systemic inflammatory disorders. *American journal of veterinary research*, 73(7), 939–945. <https://doi.org/10.2460/ajvr.73.7.939>

Drobin, D., & Hahn, R. G. (2002). Kinetics of isotonic and hypertonic plasma volume expanders. *Anesthesiology*, 96(6), 1371–1380. <https://doi.org/10.1097/0000542-200206000-00016>

Duvekot, J.J., Cheriex, E.C., Tan, W.D., Heidendal, G. A. K., Peeters, L. L. H. (1994). Volume-dependent echocardiographic parameters are not useful for estimating baseline blood volume but are useful for detecting acute changes in vascular filling state. *Basic Res Cardiol*, 89, 270–277. <https://doi.org/10.1007/BF00795619>

Fink M. P. (2001). Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Critical care clinics*, 17(1), 219–237. [https://doi.org/10.1016/s0749-0704\(05\)70161-5](https://doi.org/10.1016/s0749-0704(05)70161-5)

- Fox, P. R., Liu, S. K., & Maron, B. J. (1995). Echocardiographic assessment of spontaneously occurring feline hypertrophic cardiomyopathy. An animal model of human disease. *Circulation*, 92(9), 2645–2651. <https://doi.org/10.1161/01.cir.92.9.2645>
- Goertz, A. W., Mehl, T., Lindner, K. H., Rockemann, M. G., Schirmer, U., Schwilk, B., & Georgieff, M. (1995). Effect of 7.2% hypertonic saline/6% hetastarch on left ventricular contractility in anesthetized humans. *Anesthesiology*, 82(6), 1389–1395. <https://doi.org/10.1097/0000542-199506000-00010>
- Gommeren, K., Desmas, I., Garcia, A., Clercx, C., Mc Entee, K., & Peeters, D. (2012). Cardiac ultrasound in canine emergencies with a systemic inflammatory response syndrome. In 2nd Edition, Scientific Day.
- Hamacher, L., Dörfelt, R., Müller, M., & Wess, G. (2015). Serum cardiac troponin I concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary internal medicine*, 29(1), 164–170. <https://doi.org/10.1111/jvim.12474>
- Hinshaw L. B. (1996). Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Critical care medicine*, 24(6), 1072–1078. <https://doi.org/10.1097/00003246-199606000-00031>
- Kien, N. D., & Kramer, G. C. (1989). Cardiac performance following hypertonic saline. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 22(2), 245–248.
- Kien, N. D., Reitan, J. A., White, D. A., Wu, C. H., & Eisele, J. H. (1991). Cardiac contractility and blood flow distribution following resuscitation with 7.5% hypertonic saline in anesthetized dogs. *Circulatory shock*, 35(2), 109–116.
- Lopes, O. U., Pontieri, V., Rocha e Silva, M., Jr, & Velasco, I. T. (1981). Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock: role of the innervated lung. *The American journal of physiology*, 241(6), H883–H890. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1981.241.6.H883>
- McLean, AS. (2016). Echocardiography in shock management. *Critical Care*, 20(1), 275. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1401-7>
- Mouren, S., Delayance, S., Mion, G., Souktani, R., Fellahi, J. L., Arthaud, M., Baron, J. F., & Viars, P. (1995). Mechanisms of increased myocardial contractility with hypertonic saline solutions in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Anesthesia and analgesia*, 81(4), 777–782. <https://doi.org/10.1097/0000539-199510000-00021>
- Muir, W. W., 3rd, & Sally, J. (1989). Small-volume resuscitation with hypertonic saline solution in hypovolemic cats. *American journal of veterinary research*, 50(11), 1883–1888.
- Nelson, O. L., & Thompson, P. A. (2006). Cardiovascular dysfunction in dogs associated with critical illnesses. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 42(5), 344–349. <https://doi.org/10.5326/0420344>
- Ogino, R., Suzuki, K., Kohno, M., Nishina, M., & Kohama, A. (1998). Effects of hypertonic saline and dextran 70 on cardiac contractility after hemorrhagic shock. *The Journal of trauma*, 44(1), 59–69. <https://doi.org/10.1097/00005373-199801000-00005>
- Okano, S., Yoshida, M., Fukushima, U., Higuchi, S., Takase, K., & Hagio, M. (2002). Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *The Veterinary record*, 150(8), 245–246. <https://doi.org/10.1136/vr.150.8.245>
- Rau, S., Kohn, B., Richter, C., Fenske, N., Küchenhoff, H., Hartmann, K., Härtle, S., Kaspers, B., & Hirschberger, J. (2007). Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Veterinary clinical pathology*, 36(3), 253–260. <https://doi.org/10.1111/j.1939-165x.2007.tb00220.x>
- Rush, J. E., Freeman, L. M., Fenollosa, N. K., & Brown, D. J. (2002). Population and survival characteristics of cats with hypertrophic cardiomyopathy: 260 cases (1990–1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 220(2), 202–207. <https://doi.org/10.2460/javma.2002.220.202>
- Shapiro, N. I., Schuetz, P., Yano, K., Sorasaki, M., Parikh, S. M., Jones, A. E., Trzeciak, S., Ngo, L., & Aird, W. C. (2010). The association of endothelial cell signaling, severity of illness, and organ dysfunction in sepsis. *Critical care (London, England)*, 14(5), R182. <https://doi.org/10.1186/cc9290>
- Sirieix, D., Hongnat, J. M., Delayance, S., D'Attellis, N., Vicaut, E., Bérrébi, A., Paris, M., Fabiani, J. N., Carpentier, A., & Baron, J. F. (1999). Comparison of the acute hemodynamic effects of hypertonic or colloid infusions immediately after mitral valve repair. *Critical care medicine*, 27(10), 2159–2165. <https://doi.org/10.1097/00003246-199910000-00014>
- Suzuki, K., Aoyagi, S., Koie, H., & Asano, R. (2006). The effect of 7.2% hypertonic saline solution on m-mode echocardiographic indices in normovolemic dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 68(7), 749–751. <https://doi.org/10.1292/jvms.68.749>
- Suzuki, K., Otake, M., Saida, Y., Koie, H., & Asano, R. (2008). The effect of 7.2% hypertonic saline solution with 6% dextran 70 on cardiac contractility as observed by an echocardiography in normovolemic and anesthetized dogs. *The Journal of veterinary medical science*, 70(1), 89–94. <https://doi.org/10.1292/jvms.70.89>
- Suzuki, K., Suzuki, T., Miyahara, M., Iwabuchi, S., & Asano, R. (2005). Comparison of a small volume of hypertonic saline solution and dextran 40 on hemodynamic alternations in conscious calves. *Journal of veterinary science*, 6(2), 111–116.
- Tavanaeimanesh, H., Dezfouli, M. R., Vajhi, A., Rostam, A., Akbarinejad, V., Sadeghian Chaleshtori, S., & Corley, K. T. (2015). The effect of 7.2% hypertonic saline solution on echocardiographic parameters of healthy horses. *Equine veterinary journal*, 47(6), 741–744. <https://doi.org/10.1111/evj.12496>
- Torrente, C., Manzanilla, E. G., Bosch, L., Fresno, L., Rivera Del Alamo, M., Andaluz, A., Saco, Y., & Ruiz de Gopegui, R. (2015). Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)*, 25(5), 611–619. <https://doi.org/10.1111/vec.12340>
- Us, M. H., Ozkan, S., Oral, L., Oğuş, T., Acar, H. V., Cakir, O., Keskin, O., Top, C., & Gökben, M. (2001). Comparison of the effects of hypertonic saline and crystalloid infusions on haemodynamic parameters during haemorrhagic shock in dogs. *The Journal of international medical research*, 29(6), 508–515. <https://doi.org/10.1177/147323000102900607>
- Velasco, I. T., & Baena, R. C. (2004). The role of the vagus nerve in hypertonic resuscitation of hemorrhagic shocked dogs. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 37(3), 419–425. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004000300020>

- Velasco, I. T., Pontieri, V., Rocha e Silva, M., Jr, & Lopes, O. U. (1980).** Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *The American journal of physiology*, 239(5), H664–H673.
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.1980.239.5.H664>
- Waagstein, L. M., Wennberg, E., Waagstein, F., & Haljamäe, H. (1999).** Hypertonic saline without or with dextran-70 in the treatment of experimental acute myocardial ischemia and reperfusion. *Critical care medicine*, 27(3), 605–616.
<https://doi.org/10.1097/00003246-199903000-00043>
- Wildenthal, K., Adcock, R. C., Crie, J. S., Templeton, G. H., & Willerson, J. T. (1975).** Negative inotropic influence

of hyperosmotic solutions on cardiac muscle. *The American journal of physiology*, 229(6), 1505–1509.
<https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.229.6>.

Stereotypic Behaviour Observed in a Thoroughbred Horse after the Earthquake: Box Walking

Yavuzkan PAKSOY¹, Özlem GÜCÜYENER HACAN^{2*}

¹Department of Plant and Animal Production, Konya Ereğli Kemal Akman Vocational School, Necmettin Erbakan University, Konya, Türkiye

²Department of Animal Science, Faculty of Veterinary Medicine, Afyon Kocatepe University, Afyonkarahisar, Türkiye

ABSTRACT

The material of this case report consisted of an 8-year-old Thoroughbred horse. According to the information, it was learned that the horse was alone in the box (4m x 5m) during the earthquake that morning of February 6, was frightened by the shaking and noises, and exhibited the box walking (circling) stereotypic behaviour in the box since then. It was seen that the horse was constantly circling and seemed exhausted on the following days. It was determined that the horse has lost weight, reacted even to very small sounds, got scared, sought a way to escape the box, and behaved aggressively. The daily amount of hay in the ration increased, and also plastic ball, mirror, and 24-hour radio were placed in box to prevent this stereotypic behaviour. At the end of 10 days, it was observed that the behaviour of being afraid of sounds has continued, the behaviour of turning around itself has decreased, and it seemed these were rarely exhibited only in the dark times of the day. A month later, it was determined that the horse continued to training program without any problems, and box walking behaviour was only performed for a short time before feeding. As a result, it is thought that sharing this case of box walking, which is one of the stereotypic behaviours observed in stressed horses, with our colleagues will contribute to the field.

Key words: Box walking, Horse, Stereotypic behaviour, Stress

Deprem Sonrası Bir Safkan İngiliz Atta Gözlenen Stereotipik Davranış: Kendi Etrafında Dönme

ÖZ

Bu olgu sunumunun materyalini 8 yaşlı bir safkan İngiliz atı oluşturdu. Alınan bilgilerde atın, 6 Şubat tarihinde gerçekleşen deprem sırasında boksunda (4m x 5m) bireysel olarak barındırıldığı, sallantıdan ve seslerden ürktüğü ve o günden itibaren boksta dönme stereotipik davranışını sergilediği öğrenildi. İlerleyen günlerde atın, sürekli olarak döndüğü ve bitkin durumda olduğu görüldü. Kilo kaybettiği, çok düşük düzeydeki seslere bile tepki gösterdiği, ürktüğü, bokstan kaçmak için çare aradığı ve saldırgan davranışlarda bulunduğu tespit edildi. Stereotipik davranışın önlenmesi için rasyondaki günlük kuru ot miktarı artırıldı, boksa plastik top, ayna ve 24 saat çalan radyo kondu. 10 günün sonunda atta seslerden ürme davranışının devam ettiği, boksta dönme davranışının azaldığı ve yalnızca karanlık saatlerde nadiren sergilendiği görüldü. Bir ay sonra atın sıkıntısız bir şekilde idmanlara devam ettiği, dönme davranışının yalnızca yemleme öncesi ve kısa süreli olarak gerçekleştirdiği belirlendi. Sonuç olarak stres altındaki atlarda gözlenen stereotipik davranışlardan olan boksta dönme olgusunu meslektaşlarımızla paylaşmanın alana katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: At, Boksta dönme davranışı, Stereotipik davranış, Stres

To cite this article: Paksoy Y, Gücüyener Hacan Ö. Stereotypic Behaviour Observed in a Thoroughbred Horse after the Earthquake: Box Walking. Kocatepe Vet J. (2023) 16(2):248-251

Submission: 03.04.2023 Accepted: 31.05.2023 Published Online: 05.06.2023

ORCID ID: YP: 0000-0002-0935-7693, ÖGH: 0000-0001-6340-1117

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

INTRODUCTION

The behaviour defines as the response of a living thing to stimuli in its own environment. Horses, like all living creatures, have their own behaviours. If these behaviours are common in all horses, they are called normal behaviours. Feeding, sexual and maternal behaviours are examples of normal behaviours. Abnormal behaviours (stereotypic behaviour), which are also defined as defects, can be observed in some horses. Wood chewing, cribbing, weaving, and box walking are some of these behaviours (Cooper and Mason, 1998; Nicol, 1999). Stereotypic behaviours cause financial losses as they affect performance and efficiency in horses (Houpt and McDonnell, 1993; McBride and Long, 2001; Wickens and Houpt, 2015). To get the best efficiency from animals, abnormal behaviours should be eliminated (Gücüyener Hacan and Akçapınar, 2013). Stressful conditions in horses can lead to the development of stereotypical behaviours. Generally, abnormal behaviour is abandoned once the stress factor is no longer exist. In some cases, although the stimulus disappears, the horses cannot stop these behaviours because of the fear of repetition. When this condition is permanent, it might be considered as a behavioural disorder (Mills, 1998). Box walking is one of the most important stereotypical behaviours. Horses want to flee when they feel threatened. If they cannot flee, they start spinning in the box (McBane, 1992; Beaver, 2019). There is no certain treatment for stereotypic behaviour. The success rate of forgetting the behaviour can be increase, by attracting the attention of the horse to new environmental factors. Eliminating stress factors, regulating nutrition, and making in-box enrichments to prevent boredom are positive effects that help to get rid of abnormal behaviour (Young, 2003; Houpt, 2005; Henderson, 2007).

CASE HISTORY

The material of this case report consisted of an 8-years-old Thoroughbred horse, which was used in show jumping in Adana province, and the horse developed box walking after the earthquake. According to the information, it was learned that the horse was alone in the box (4m x 5m) during the earthquake that morning of February 6, was frightened by the shaking and noises, and exhibited the box walking (circling) stereotypic behaviour in the box since then (Figure 1). This behaviour has been reported to persist, sometimes for hours. It was stated that the horse, which relaxes and grazes when it goes out and is together with other horses in the paddock, shows this behaviour after it enters the box and also lost interest in eating.

The horse was started to be followed by the keeper, trainer and veterinarian with observation and camera recordings. The horse was found to be constantly

circling and exhausted on 10th of February. It was observed that it lost weight, reacted to even very small noises, was frightened, sought a way to flee from the box, and acted aggressively. It was also observed that as the time spent in the box and the stress increased, it circling more. Some management practices were carried out to prevent startle and stereotypic behaviour. The period of stay in the box has been extended from 11th of February. A radio was placed in the box and played 24 hours for the horse to get used to the sounds. A mirror (2m x 1m) was mounted in the wall where it could see itself completely, and it was aimed to focus his attention there and make him less bored in the box. A plastic ball was placed in every corner of the box, and it was seen that the horse spent a significant amount of the day with these balls. His ration was rearranged, and the amount of roughage given was increased from 5 kg to 10 kg per day.

At the end of the 10-day practice, on the 21st of February, it was observed that the horse was more comfortable in the box, although the behaviour of being scared of the sounds continued, and it rarely showed the behaviour of box walking in the dark times of the day.



Figure 1: Box walking

DISCUSSION

It has been reported that the rate of abnormal behaviour in domestic horses is more than 15% (Luescher et al., 1991), and this rate is higher in hot-blooded horses, especially in purebred Arabian and Thoroughbred horses than in other breeds (McGreevy et al. 1995; Pell and McGreevy 1999; Mills et al., 2002; Bachmann et al., 2003; Beaver 2019). The fact that the horse that was the subject of this case report was a Thoroughbred competition horse showed parallelism with this situation. Stereotypic behaviours may be seen when horses are alone, do insufficient training, or encounter a disturbing stimulus (Prince and Collier 1974; Gücüyener Hacan and Akçapınar 2013). In our case, the presence of shaking and noise stimuli that threatened the horse during the earthquake and the fact that it was alone in the box during the earthquake supports the literature. The frequency and duration of the box walking behaviour increase over time (Beaver 2019), and horses displaying this behaviour are exhausted, anxious, and unhappy (Haupt et al., 1996). Similar symptoms were observed in the horse in our case.

It has been reported that horses that show serious circling behaviour lose their condition, their racing or sports performances are adversely affected, and their economic values decrease (McBride and Long 2001; Wickens and Haupt 2015). It was observed that the horse presented in our case was reluctant to practice because it was always in motion in the box. It could not jump and it dropped obstacles even at low levels because it was sluggish while jumping over obstacles. It is thought that this situation will also reduce its economic value, as it cannot train regularly.

Some management practices are recommended to prevent stereotypic behaviours. As a result of these applications, it is possible to extinguish abnormal behaviour by reducing the stress of the horse. It is stated that increasing the daily amount of roughage in the diet is effective in preventing abnormal behaviours (Haupt et al., 1996; Bachmann et al., 2003). Parallel to this, the amount of roughage in the ration was increased. It has been reported that toys and mirrors in the box are effective in the box walking behaviour of horses (McAfee et al., 2002; Camargo 2014). In our case, as in previous literature, a plastic ball, mirror, and 24-hour radio were placed in the horse's box. At the end of the 10-day practice, it was observed that the behaviour of frightened by the sounds was continued and it rarely showed the behaviour of box walking during the dark hours. One month later, it was determined that the horse continued to train without any problems, and that the box walking behaviour was seen for a short time only before feeding.

CONCLUSION

In conclusion, in this case report it is aimed to convey the stereotypic behaviour of box walking, which can be observed in horses under stress, causing financial and emotional damage and the ways to prevent it, to colleagues, and to contribute to the literature.

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

Authors Contribution Rate: The authors declared that they contributed equally to the article.

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

REFERENCES

- Bachmann, I., Audige, L., & Stauffer, M. (2003). Risk factors associated with behavioural disorders of cribbing, weaving and box-walking in Swiss horses. *Equine Veterinary Journal*, 35(2), 158-163.
- Beaver, B. V. (2019). *Equine Behavior Problems*. In: *Equine Behavioral Medicine*, Elsevier Inc., London, UK.
- Camargo, F. (2014). Stereotypic behavior in horses: Weaving, stall walking and cribbing, agriculture and natural resources publications, 144.
- Cooper, J.J., & Mason, G.J., (1998). The identification of abnormal behaviour and behavioural problems in stabled horses and their relationship to horse welfare: A comparative review. *Equine Veterinary Journal*, 27, 5-9.
- Gücüyener Hacan, Ö., & Akçapınar, H. (2013). Atlarda Davranış. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 53(1), 47-57.
- Henderson, A. J. Z. (2007). Don't fence me in: Managing psychological well being for elite performance horses. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 10, 309-329.
- Haupt, K.A., McDonnell, S.M., & Ralston, S. (1996). Equine stereotypies. In: Voith, V.L., Borchel, P.L. (Ed), *Readings in companion animal behavior*. Veterinary Learning Systems, New Jersey, pp. 159-166.
- Haupt, K.A. (2005). Equine maintenance behavior. In: Mills, D., McDonnell, S. (Ed), *The domestic horse: The evolution, development and management of its behavior*. Cambridge University Press.
- Luescher, U., McKeown, D.B., & Halip, J. (1991). Reviewing the causes of obsessive-compulsive disorders in horses. *Veterinary Medicine*, 86, 527-531.
- McAfee, L. M., Mills, D. S., & Cooper, J. J. (2002). The use of mirrors for the control of stereotypic weaving behavior in the stabled horse. *Applied Animal Behaviour Science*, 78, 159-173.
- McBane, S. (1992). *A natural approach to horse management*. Methuen Publishing.

- McBride, S.D. & Long, L. (2001).** Management of horses showing stereotypic behaviour, owner perception and the implications for welfare. *Veterinary Record*, 148, 799-802.
- McGreevy, P.D., Cripps, P.J., French, N.P., Green, L.E., & Nicol, C. J. (1995).** Management factors associated with stereotypic and redirected behaviour in the Thoroughbred horse. *Equine Veterinary Journal*, 27(2), 86-91.
- Mills, D.S. (1998).** Personality and individual differences in the horse, their significance, use and measurement. *Equine Veterinary Journal*, 27, 10-13.
- Mills, D. S, Alston, R. D., Rogers, V., & Longford, N. T. (2002).** Factors associated with the prevalence of stereotypic behaviour amongst Thoroughbred horses passing through auctioneer sales. *Applied Animal Behaviour Science*, 78, 115-124.
- Nicol, C. (1999).** Understanding equine stereotypes. *Equine Veterinary Journal*, 31(28), 20-25.
- Pell, S. M., & McGreevy, P. D. (1999).** Prevalence of stereotypic and other problem behaviours in Thoroughbred horses. *Australian Veterinary Journal*, 77, 678- 679.
- Prince, E.F., & Collier, G. M. (1974).** Basic horsemanship: English and western. Broadway Books, New York.
- Wickens, C. L., & Houpt, K. A. (2015).** Stereotypic and behavior disorders. In: Furr, M., Reed, S. (Ed), *Equine neurology*, Blackwell, Ames, USA, pp. 472-483.
- Young, R.J. (2003).** Environmental enrichment for captive animals. Blackwell Science, Oxford, UK.