



**Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni**  
*Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association*

e-ISSN: 2667-8381



**Cilt (Volume): 14 - Sayı (Issue): 1 - 2023**  
<https://dergipark.org.tr/vetfarmatoksbulten>

Ülkemizde 06 Şubat 2023 tarihinde gerçekleşen Deprem Felaketi sebebiyle, Bülten Kapağı Siyah renkte çıkarılmıştır.



Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

**Baş Editör / Editor-in-Chief**

Prof.Dr. Ender YARSAN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)



**Editörler Kurulu / Editorial Board**

Prof. Dr. Levent ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Prof.Dr. Füsün TEMAMOĞULLARI(Harran Üniversitesi, Türkiye)  
Prof.Dr.Begüm YURDAKÖK DİKMEN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ (Kırıkkale Üniversitesi, Türkiye)  
Doç.Dr. Mustafa YİPEL(Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye)  
Dr. Sedat SEVİN (Ankara Üniversitesi, Türkiye)

**Danışma Kurulu / Advisory Board**

Prof.Dr. Abdurrahman AKSOY (Ondokuzmayıs Üniversitesi)	Prof.Dr. Cavit KUM (Adnan Menderes Üniversitesi)
Prof.Dr. Arif ALTINTAŞ (Ankara Üniversitesi)	Prof.Dr. Aneliya MILANOVA (Trakya Üniversitesi, Bulgaristan)
Prof.Dr. Nuri ALTUĞ (Namık Kemal Üniversitesi)	Prof.Dr. Songül SONAL (Uludağ Üniversitesi)
Prof.Dr. Yavuz Osman BİRDANE (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. İbrahim TAŞAL (Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)
Prof.Dr. Mehmet ÇALICIOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr. Bünyamin TRAŞ (Selçuk Üniversitesi)
Prof.Dr. Gürdal DAĞOĞLU (Fırat Üniversitesi)	Prof.Dr.Murat YILDIRIM (İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi)
Prof.Dr. İbrahim DEMİRKAN (Afyon Kocatepe Üniversitesi)	Prof.Dr. Ali Cesur ONMAZ (Erciyes Üniversitesi)
Prof.Dr. Ahmet DOĞANAY (Ankara Üniversitesi)	Dr. Ishraga G. IBRAHİM (Central Veterinary Res Lab, Sudan) Dr.
Prof.Dr. Gökhan ERASLAN (Erciyes Üniversitesi)	Dr. Shahram SAGHAEI (Orumieh Azad Üniversitesi, İran)
Prof.Dr. İzzet KARAHAN (Balıkesir Üniversitesi)	Dr. Tomaž SNOJ (Ljubljana Üniversitesi, Slovenya)





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association



**İmtiyaz Sahibi :** Prof.Dr. Ender YARSAN

**Yazı İşleri Müdürü :** Prof.Dr. Levent ALTINTAŞ

**Dernek Yazışma Adresi :** Atmaca Sokak No: 8/3 06110, Dışkapı- Ankara

**Kapak Tasarım :** Makromedya Halkla İlişkiler Ltd. Şti.

**Dizgi :** Doç.Dr. Hüsamettin EKİCİ

Bültenin amacı, bilimsel etik kuralları çerçevesinde, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji ile ilgili ulusal - uluslararası literatüre katkıda bulunacak derleme türünde çalışmalarını yayınlamaktır. Yılda üç kez yayınlanan kör hakemli bir açık erişim bültenidir. Bültenin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir. Alınan tüm yazılar intihal yazılımları (iThenticate veya Turnitin programı) ile kontrol edilmektedir.

Bültenimiz 2019 yılı Cilt 10, Sayı 1'den itibaren ResearchBib (Academic Research Index), ESJI (Eurasian Scientific Journal Index), ROOTINDEXING, Google Scholar, Sindex (Scientific Indexing Services), 2020 yılı Cilt 11, Sayı 1'den itibaren de ASOS İndeks, Türkiye Atıf Dizini, Index Copernicus, TR Dizin ve ve 2023 yılından itibaren ise SOBIAD indeksleri tarafından taranmaktadır. Bültenimizde yayınlanacak makalelere Cilt: 11, Sayı: 1'den itibaren DOI numarası verilmektedir.

Her Hakkı Saklıdır. Bülteinde yer alan yazılar kaynak gösterilerek alıntı yapılabilir. Yazıların her türlü sorumluluğu yazarlara aittir.

İletişim: vftdbulten@vetfarmatoks.org.tr





Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni  
Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

Cilt: 14 - Sayı: 1- 2023

06.05.2023

- 
1. YAPAY ET ÜRETİMİNDE TEKNOLOJİK GELİŞMELER VE ENDÜSTRİSİNİN GELECEĞİ  
*TECHNOLOGICAL DEVELOPMENTS IN ARTIFICIAL MEAT PRODUCTION AND THE FUTURE OF THE INDUSTRY*  
Ömer ÇAKMAK, Erdi ERGENE, Ulaş ACARÖZ, Tuba ALDEMİR.....1
  2. EFFECTS OF YUCCA SCHIDIGERA AS A FUNCTIONAL FEED ADDITIVE IN DOG DIETS  
*YUCCA SCHIDIGERA'NIN KÖPEK DİYETLERİNDE FONKSİYONEL KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMI VE ETKİLERİ*  
Merve GÖKLER, Oğuzhan KAHRAMAN, Zekeriya Safa İNANÇ.....16
  3. PROTOZONLARIN VİRAL ENDOSİMBİYONTLARI  
*VIRAL ENDOSYMBIONTS OF PROTOZOA*  
Ayşegül DAMLAPINAR, Kader YILDIZ .....25
  4. INVESTIGATION OF THE ROLE OF STRESS IN MALE INFERTILITY AND THE EFFECT OF CURRENT MELATONIN HORMONE TREATMENTS  
*ERKEK İNFERTİLİTESİNDE STRESİN ROLÜ VE UYGULANAN GÜNCEL MELATONİN HORMON TEDAVİLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ*  
İshak GÖKÇEK, Leyla AYDIN.....36
  5. GUT-HEART AXIS  
*KALP BAĞIRSAK EKSENİ*  
Cansu BALIKÇI, Gamze GÖKÇAY, Songül ERDOĞAN, Hasan ERDOĞAN, Kerem URAL.....49



# Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

## Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Ömer ÇAKMAK<sup>1a</sup>  
Erdi ERGENE<sup>1b</sup>  
Ulaş ACARÖZ<sup>2c</sup>  
Tuba ALDEMİR<sup>3d</sup>

<sup>1</sup>İstanbul Esenyurt Üniversitesi,  
Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu,  
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü,  
İstanbul

<sup>2</sup>Afyon Kocatepe Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi, Besin/Gıda  
Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı,  
Afyonkarahisar

<sup>3</sup>İstanbul Esenyurt Üniversitesi, Meslek  
Yüksekokulu, Aşçılık Programı, İstanbul

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0001-7658-1284

ORCID<sup>b</sup>: 0000-0001-7555-5148

ORCID<sup>c</sup>: 0000-0002-1879-4414

ORCID<sup>d</sup>: 0000-0001-7419-3640

\*Sorumlu Yazar: Ömer ÇAKMAK  
E-Posta: omercakmak@esenyurt.edu.tr

Geliş Tarihi: 10.01.2023  
Kabul Tarihi: 18.04.2023

14 (1): 1-15, 2023  
DOI: 10.38137/vftd.1231634

### Makale atfı

Çakmak, Ö. ve ark. (2023). Yapay Et Üretiminde Teknolojik Gelişmeler Ve Endüstrisinin Geleceği, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (1), 1-15. DOI: 10.38137/vftd.1231634

## YAPAY ET ÜRETİMİNDE TEKNOLOJİK GELİŞMELER VE ENDÜSTRİSİNİN GELECEĞİ

**ÖZET.** Et tüketimi, sağlıklı ve dengeli beslenmenin en önemli şartlarından biri olmasına rağmen dünya nüfusundaki artışa bağlı olarak kişi başı talebin karşılanması zorlaşmaktadır. Tüketici tercihlerindeki değişim ve geleneksel et üretimindeki kaynak kullanımının sürekli artması ile ortaya çıkan arz-talep dengesizliği alternatif protein kaynaklarına yönelimi zorunlu hale getirmektedir. Bu nedenle; genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), bitkisel bazlı kaynaklardan elde edilen et alternatifleri ve kültür eti protein ihtiyacının karşılanmasına yönelik ortaya çıkan fikirler arasında yer almaktadır. Yapay et üretimi, geleneksel et üretiminden kaynaklanan beslenme ve halk sağlığı, iklim değişikliği, çevre kirliliği, sürdürülebilirlik ve hayvan refahı ile ilişkili ortaya çıkan ciddi sorunların azaltılmasında potansiyel bir çözüm olarak sunulmaktadır. Yapay etin üretim prosedürlerinin hazırlanması, lezzet kriterlerinin sağlanması, risk analizlerinin belirlenmesi ve gerekli yasal düzenlemelerin yapılması sürdürülebilir besin kaynakları arasında yer alması bakımından önemlidir. Aynı zamanda yapay etin maliyetinin yüksek olması, etik ve dini inanışlar nedeniyle tüketici algısındaki güven sorununa karşı üretim sürecindeki avantajların belirtilmesi önem arz etmektedir. Bu makale; yapay et üretiminin tarihsel gelişim süreci, üretim yöntemleri, alternatif protein kaynakları, avantaj ve dezavantajları, yapay et endüstrisinin geleceği, tüketicilerin yapay ete yönelik tutum ve kaygıları hakkında yapılan araştırmalardan derlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Alternatif protein kaynakları, Bitkisel bazlı et, Geleneksel et, Nanoteknoloji, Yapay et.

## TECHNOLOGICAL DEVELOPMENTS IN ARTIFICIAL MEAT PRODUCTION AND THE FUTURE OF THE INDUSTRY

**ABSTRACT.** Although meat consumption is one of the most important conditions of healthy and a balanced diet, it becomes difficult to meet the demand per capita due to the increase in the world population. The change in consumer preferences and the constant increase in the use of resources in the traditional meat production method, the supply-demand imbalance that arises makes it necessary to turn to alternative protein sources. Because; genetically modified organisms (GMOs), meat alternatives obtained from plant-based sources, and cultured meat are among the emerging ideas for meeting protein needs. Artificial meat production is presented as a potential solution to reduce the serious problems related to nutrition and public health, climate change, environmental pollution, sustainability and animal welfare originating from traditional meat production. Preparation of artificial meat production procedures, providing taste criteria, determining risk analyzes and making necessary legal arrangements are important in terms of being among sustainable food sources. At the same time, it is important to specify the advantages in the production process against the problem of trust in consumer perception due to the high cost of artificial meat and ethical and religious beliefs. This article; It has been compiled from research on the historical development process of artificial meat production, production methods, alternative protein sources, advantages and disadvantages, the future of the artificial meat industry, consumers' attitudes and concerns towards artificial meat.

**Keywords:** Alternative protein sources, Plant-based meat, Traditional meat, Nanotechnology, Artificial meat.



## GİRİŞ

Yeterli ve dengeli beslenme, toplumu oluşturan bireylerin sağlıklı ve güçlü olarak yaşamını sürdürmesinde, ekonomik ve sosyal yönden gelişmesinde, refah düzeyinin artmasında, varlığını güvenli bir şekilde sürdürebilmesinde temel koşullardan biridir (Saygın-Alparslan ve Demirbaş, 2019). Ülkelerin gelişmişlik düzeyi ve bireylerin yaşam standardının belirlenmesinde kişi başına düşen et tüketimi önemli bir kriter olarak kabul edilmektedir. (Uzundumlu ve ark., 2011).

Sağlıklı ve dengeli beslenmenin en önemli şartlarından biri kişi başına tüketilmesi gereken günlük protein miktarının %40-50'sinin hayvansal kaynaklardan sağlanmasıdır. Kaliteli bir protein kaynağı olan et; büyüme, gelişme ve fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde ihtiyaç duyulan bir çok bileşeni içermektedir. (Atay ve ark., 2004). Et, içeriğinde yer alan yüksek biyolojik değerli proteinler sayesinde insan beslenmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir (Bingöl ve Bostan, 2012; Akkaya, 2019). Yeterli ve dengeli beslenme açısından hayvansal kaynaklar arasında oldukça yüksek öneme sahip olan kırmızı et; vitamin, bazı mineraller (özellikle fosfor ve demir bakımından) ve biyolojik değeri yüksek, kaliteli protein içeriğince zengin, lezzetli ve besleyici bir gıda maddesidir (Yıbar ve Çetin, 2014).

Et, küresel düzeyde mevcut proteinlerin %15'ini ve kalori ihtiyacının %8'ini karşılamaktadır. Bununla birlikte, diyetlere katkısı ülkeler arasında önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. Et tüketimi, sosyo-ekonomik (örn. gelir, cinsiyet, eğitim düzeyi) ve kültürel farklılıklar nedeniyle yüksek gelirli ülkelerde ortalama 30 g protein/kişi/gün ile en yüksek düzeydedir. Bu ülkelerde mevcut protein ihtiyacının %27'si etten sağlanırken, süt, balık ve yumurta %28'ini karşılamaktadır. Üst orta gelirli ülkelerde et, ortalama 20 g/kişi/gün ile mevcut proteinin %20'sinden fazlasını karşılamaktadır. Kişi başına düşen gelirlerin üst orta gelirli ülkelerde önümüzdeki on yılda artması sonucunda yüksek gelirli ülkelerle arasındaki et tüketimi açığının kademeli olarak azalması beklenmektedir. Bununla birlikte, alt orta ve düşük gelirli ülkelerde, etin diyet katkısı nispeten daha az olup (toplam proteinlerin %10'undan az); proteinlerin %70'inden fazlası bitkisel kaynaklardan sağlanmaktadır. Kişi başına ortalama et tüketim mevcudiyeti, yüksek gelirli ülkelere göre 5 g protein/kişi/gün ile altı kat daha düşük düzeydedir. Et tüketiminin düşük olması temel olarak gelir seviyesinden

kaynaklansa da, tedarik zinciri sorunları (örneğin soğuk zincir altyapısının olmaması) ve hayvansal olmayan protein kaynaklı diyet tercihleri de talebi sınırlamaktadır (Frezal ve ark., 2022).

1960'lı yıllardan itibaren birçok ülkede et tüketimi artış göstermeye başlamıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, et tüketiminin 1960-2010 yılları arasındaki dönemde %204, 1992-2016 yılları arasındaki dönemde ise %500 artış gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu veriler beslenme alışkanlıklarının son yıllarda büyük ölçüde değiştiğini göstermektedir (Polat ve Yılmaz-Tuncel, 2020). Nitekim et endüstrisinin artan nüfusa (tahminen 2050 yılında 9,7 milyar) bağlı olarak kişi başı et ihtiyacını karşılaması için üretimini yaklaşık %50-73 oranında arttırması gerektiği belirtilmektedir. Ancak tarım alanları ve su kaynaklarının yetersizliği nedeniyle et üretim kapasitesi sınırlı kalmaktadır (Choudhury ve ark., 2020).

Küresel et arzının, 2031 yılına kadar 377 milyon metrik tona ulaşacağı tahmin edilmektedir. Hayvan yetiştiriciliği, yönetimi ve teknolojisi alanındaki sürekli iyileştirme faaliyetleri düşük ve orta gelirli ülkelerde hem üretkenliğin artmasına hem de üretimin büyümesine destek sağlayacaktır. Et üretimindeki toplam artışın büyük ölçüde Çin tarafından sağlanacağı ve bunu Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Brezilya ve Hindistan'ın izleyeceği düşünülmektedir (OECD/FAO, 2022).

Geleneksel et, besleyici özellikleri ve tadı nedeniyle popüler bir protein kaynağıdır. Dünya nüfusunun artmasıyla birlikte et tüketimi de artış göstermektedir. Bununla birlikte, et üretimi ve tüketimi ile ilişkili olarak ortaya çıkan çevresel kaygılar, alternatif et kaynaklarına olan ilginin artmasına neden olmaktadır (Ko ve ark., 2021). Nitekim piyasada erişilebilir durumda ve tüketici kabul edilebilirliği olan bitki bazlı et alternatifleri de yer almaktadır. Tat ve dokularına atfedilen olumsuzluklar nedeniyle toplam pazarın sadece küçük bir bölümünü oluşturmaktadırlar (Hoek ve ark., 2011). Ayrıca yaşanan gelişmeler karşısında başka bir çözüm önerisi de, canlı hayvan hücrelerinden ekstrakte edilerek *in vitro* olarak laboratuvar ortamında üretilen kültür eti fikrinin ortaya çıkmış olmasıdır (Zhang ve ark., 2021). *In vitro* et üretimi, geleneksel et üretimine göre insan sağlığı, hayvan refahı ve çevresel yönden avantajlara sahiptir (Bhat ve ark., 2017).

Büyük ölçekli yapay kültür et üretimi, hayvancılık üretim sistemi ile ilgili birçok çevresel

sorunun çözülmesine yardımcı olacaktır. Nitekim kültür et üretimi ile arazi kullanımını %99, su kullanımını %96 ve enerji tüketimini %45 oranında azalacağı tahmin edilmektedir. Kültür etinin geleneksel sığır eti, domuz eti ve tavuğa kıyasla karbon ayak izini sırasıyla %92, %52 ve %17'ye kadar, hava kirliliğini de %93, %49 ve %29'a kadar azalttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

İnsan beslenmesi için yapay et fikri, Winston Churchill'in makalesinde ve daha sonra 1932'de "Düşünce ve Macera" kitabında ifade edilmiştir. 1960'tan 2000 yılına kadar bilim insanları kas oluşum mekanizmasını netleştirerek embriyonik kök hücrelerinin *in vitro* olarak çok çekirdekli miyotüpleri oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Benjaminson ve ark. (2002), astronotlar için uzun süreli hayvansal protein ihtiyacını karşılamak amacıyla Japon balığı (*Carassius auratus*) kas dokusunu petri ortamında kültüre etmişler. Duyusal değerlendirme sonuçlarına göre kültüre edilmiş kas dokusunun pişirilerek gıda olarak kullanılabilirliğini bildirmişlerdir. 2011 yılında araştırmacılar, hindilerden biyopsi yöntemi ile elde edilen kas hücrelerini sığır serumu ile kültüre ederek hindi eti şeritlerini üretmişlerdir. 2012 yılında Hollandalı bilim adamı Mark Post tarafından 6 yıllık araştırma sonucunda dünyanın ilk yapay kültür eti piyasaya sürülmüştür. Kasım 2019'da Çin'li bilim adamı Guanghong Zhou tarafından domuz kası kök hücrelerinden 5 g'lık yapay kültür eti üretilmiştir (Zhang ve ark., 2021).

Gıda üretim teknolojileri ve yenilikleri her ne kadar gıda güvenliği ve sürdürülebilirliği açısından önemli olsa da, yeni gıda ürünlerinin tüketiciler tarafından kabul edilmesinde tereddüte neden olmaktadır. Teknolojik ilerlemenin olumlu algılandığı diğer sektörlerin aksine tarım-gıda sektöründeki yeniliklere tüketiciler tarafından gıdanın doğal yapısından ödün verme endişeleri nedeniyle genellikle olumsuz bakılmaktadır (Zhang ve ark., 2022).

Yapay etin ticarileştirilmesinin önünde bazı zorluklar bulunmaktadır. Bunlardan ilki yapay etin üretim aşamalarıdır. Büyüme ortamı; hücrelerin çoğalması, arzu edilen hücre tiplerine farklılaşma ve bir et ürünü oluşumu için gerekli besinleri içerir. Bunlardan birisi olan fetal sığır serumu kesim sırasında hamile ineklerden elde edildiği için hayvan hakları savunucuları tarafından karşı çıkmaktadır. Besleyici ve protein açısından zengin bir sıvı olan fetal sığır serumu pahalıdır ve üretim maliyetlerinin %80'nini oluşturmaktadır. Bu nedenle yapay et üretiminde birçok şirket, fetal sığır serumu kullanımını ortadan

kaldırma girişiminde bulunmuştur (Choudhury ve ark., 2020). Ayrıca et hücrelerinin büyütülmesi ve çoğaltılması sırasında kanser hücrelerinin oluşma riskine de dikkat edilmesi önemlidir (Hopkins ve Dacey, 2008; Hocquette ve ark., 2015).

Yapay et üretiminde aşılması gereken başka bir sorun ise tüketici algısıdır. Pek çok tüketici tarafından gıda güvenliği ve çevresel faydaları konusunda ortak fikir birliği olmasına rağmen yapay etin doğal olmadığı ve etik kuralları ihlal ettiği gerekçesiyle tüketilmesi reddedilmektedir. Aynı zamanda, tat ve tekstür de yapay et üretiminde çözülmesi gereken sorunlardan biridir. Buna rağmen, yapay etin üretim süreci ve avantajları hakkında bilgilendirme ile büyük ölçüde geleneksel ete karşı fiyat engelinin aşılmasına bağlı olarak yapay et tüketiminin yaygınlaşacağı tahmin edilmektedir (Choudhury ve ark., 2020).

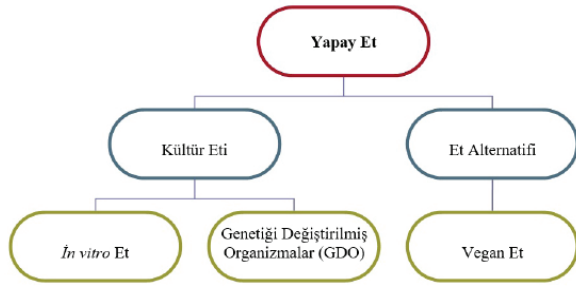
#### YAPAY ETİN SINIFLANDIRILMASI

Yapay et, bitki bazlı et alternatifleri (bitki özleri ve mantarlar) ve kültür eti (laboratuvar ortamında *in vitro* üretilen veya genetiği değiştirilmiş organizmalardan ve klonlanmış hayvanlar) olmak üzere 2 grupta sınıflandırılmıştır (Mc Clements, 2020; Mateti ve ark., 2022). Yapay etin sınıflandırılması Şekil 1'de gösterilmiştir.

Bitkisel bazlı geleneksel et alternatiflerinin (vegan et) üretiminde bitkiler ve mantarlardan elde edilen hayvansal olmayan proteinler kullanılmaktadır (Kumar ve ark., 2016). Genellikle buğday ve soya bazlı bitkisel proteinler seçilerek verimli üretim elde edilmiştir. Ancak bitki bazlı ürünlerin hem tadına hem de hissine yönelik olarak kullanılan teknolojik gelişmeler olsa da bitkisel proteinler ve şekerlerin kullanılması ile elde edilen vegan etin geleneksel etin yerini tutması zor görünmektedir. Bu nedenle bitki bazlı et, çoğunlukla hamburger, sosis veya diğer kıyılmış ürünler gibi işlenmiş et ürünlerinde kullanılmaktadır.

*In vitro* olarak kas kök hücrelerinin özel donanımlı laboratuvar koşullarında çoğaltılarak, kimyasal ve fiziksel uyarılar yardımıyla hücrelerin büyümesi ve farklılaşması sonucunda kültür etinin üretimi mümkün olmaktadır (Orzechowski, 2015). Yapay et üretiminde iskelet kas dokusu; mezenkimal kök hücreler ve doğal dokudan izole edilen kas kök hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Bu hücreler diğer hücreler ile

karşılaştırıldığında hem yüksek oranda çoğalma hem de serum içermeyen koşulda gelişebilme yeteneğine sahiptirler (Post, 2012; Oikonomopoulos ve ark., 2015). Kültür etinin üretimi için uygulanan süreç iki aşamalı olarak ele alınmaktadır. İlk aşama başlangıç hücresinden maksimum düzeyde hücre elde edilmesini hedefleyen çoğalma sürecidir. İkinci aşama ise maksimum seviyede proteinin elde edilmesi esasına dayanan farklılaşma ve olgunlaşma sürecidir (Stephens ve ark., 2018).



Şekil 1. Yapay etin sınıflandırılması (Mateti ve ark., 2022).

## KÜLTÜR ETİ ÜRETİMİ

Yenilebilir hayvan etlerinin çoğunluğu iskelet kas dokusundan oluşmaktadır. Yenilebilir et üretimi amacıyla iskelet kas dokusunun kullanıldığı yöntemler çok az araştırılmış olsa da, onlarca yıl öncesine kadar uzanmaktadır. *In vitro* üretim yaklaşımları genel olarak iskelet tabanlı ve kendini düzenleme stratejileri olmak üzere 2'ye ayrılmaktadır (Mateti ve ark., 2022).

Proliferatif miyoblastlar yani iskelet kası kök hücrelerinin, kolajen ağı gibi taşıyıcılara tohumlanmasını takiben sabit veya dönen bir biyoreaktörde kültür ortamı ile perfüze edilmesi işlemi iskelet tabanlı yöntemin bir parçasıdır. Çeşitli çevresel uyarılara maruz kaldıklarında, bu hücreler miyotüpler halinde birleşir ve sonunda kas liflerine dönüşür. Bu yöntemle elde edilen kas lifleri, et gibi pişirilerek yenilebilmektedir. İskele temelli yöntem ile hamburger veya sosis gibi kemik içermeyen et ürünlerinin üretilmesi uygun iken biftek gibi etlerin üretilmesi için uygun değildir (Dennis ve Kosnik, 2000).

GDO'lar ve klonlanmış hayvanlardan elde edilen et de kültür eti olarak kabul edilmektedir. GDO'ların genleri, başka bir organizmada DNA içerecek şekilde değiştirilir. Bu yöntem, benzerleri ile karşılaştırıldığında modifiye edilmiş ürünlerin üretilmesinde avantajlı olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır (Eenennaam

ve Louise, 2017). Hayvan klonlama sonucunda ebeveynin genetik özelliklerine sahip olan türleri ortaya konulması karmaşık bir süreçtir. Şimdiye kadar koyunlar, domuzlar, keçiler, sığırlar ve tavşanlar klonlanmış ancak hiçbiri tüketilmemiştir (Mateti ve ark., 2022).

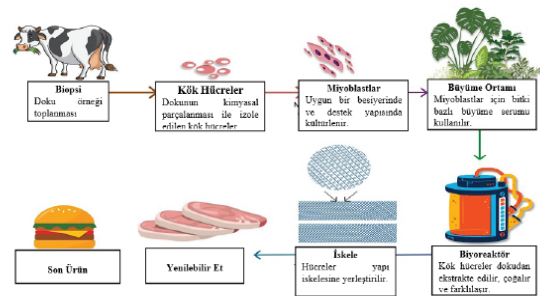
## *In vitro* Et Üretim Yöntemleri

### İskele Yöntemi

Sığır, koyun ve domuz gibi çiftlik hayvanlarından embriyonik miyoblastların ayrılması ve bitki bazlı bir büyüme ortamı kullanılarak sabit veya dönen bir biyoreaktör ortamında gelişmeleri için iskele tabanlı *in vitro* et üretim sistemine ihtiyaç vardır. Bu hücreler haftalar veya aylarca yeniden bölünerek biyoreaktör içinde yer alan iskele üzerinde kas liflerine dönüşmektedir (Seah ve ark., 2022).

Etin kitlesel olarak kültüre edilmesini sağlayan büyük ölçekli bir biyoreaktör henüz tasarlanmamıştır. Kas oluşumu, metabolik atıkları ortadan kaldırırken büyüyen kas hücreleri veya lifleri dolaşım sistemini kullanarak ihtiyaç duyduğu besin ve oksijen gereksinimini sağlamaktadır. Küçük haldeki kas parçaları, difüzyon yoluyla yeterli besin ve oksijen elde etmesine rağmen, ihtiyaç duyulan oksijen ve besin kaynağı için kan arterlerine sahip olan kültür kasları geliştirilmemiştir (Skardal ve ark., 2010).

Mevcut durumda birkaç hücre kültürü yöntemi erişilebilir olmasına rağmen *in vitro* et üretiminde en zorlu aşama optimal kültür ortamının kompozisyonunu belirlemektir. Bu kültür ortamı; ucuz olmalı, gıda bileşenlerini tamamen içeren ve büyük miktarlarda yaygın olarak erişilebilir aynı zamanda kas hücresinin gelişimi, çoğalması ve farklılaşmasını sağlamada etkili olmalıdır (Datar ve Betti, 2010). İskele yönteminin aşamaları Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. İskele yönteminin aşamaları (Mateti ve ark., 2022).



### Kültür Ortamı ve Büyüme Faktörleri

Kültür ortamı; kolayca erişilebilir, ucuz ve yenilebilir, aynı zamanda gelişmeyi sürdüren ve teşvik edici özellikte olmalıdır. Hücre büyümesi için amino asitleri, yağ asitleri, vitaminleri, iz elementleri ve hücre dışı kesecikler gibi besin maddelerini içeren ortamlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca antibiyotik/antimitotik kombinasyonlarının yanı sıra bazı kültürlerin bir embriyo ekstraktına gereksinimi vardır (Aswad ve ark., 2016).

Kas hücreleri, insülin benzeri büyüme faktörü 1'in birincil kaynağıdır ve *in vitro* et üretimi için gereklidir. Bilim adamları tarafından genellikle mitojenik büyüme faktörü seviyeleri düşürülerek miyoblast farklılaşması ve füzyonu artırılmaktadır. Daha sonra çoğalan kas hücreleri farklılaşma ve miyotüp oluşumunu sağlayan insülin benzeri büyüme faktörü 2'nin üretilmesini başlatır (Florini ve ark., 1991). Büyüme faktörleri, inhibitörler ve metabolik düzenleyicilerin belirli bir oranı söz konusu olsa da, hücre büyümesinden birincil olarak hangi serum bileşenlerinin sorumlu olduğu çoğu zaman belirsizdir (Mannello ve Tonti, 2007).

*In vitro* et üretimi ile ilişkili olan iskelenin bileşimi kültür ortamına benzer şekildedir. Hem sentetik hem de hayvansal türevli çok sayıda biyomateryal test edilmiştir. *In vitro* et üretimine yönelik denemelerde kolajen bazlı iskeleler başarılı olarak kullanılırken, sentetik biyomateryallerin kullanılmasına yönelik yapılan çalışmalarda ise kas dokusunun kasılmasında güçlüklerle karşılaşmıştır (Snyman ve ark., 2013).

### Biyoreaktör

Doku rejenerasyonunda biyoreaktör düzeneği önemlidir. Hücrelerin bir iskeleye tohumlanmasını takiben uygun büyüme ortamının eklenmesi ile inkübatörde kültürlenmenin gerçekleşmesi amacıyla sabit özellikteki biyoreaktörler yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* et üretiminde, doku büyümesini uyarabilen yüksek hacimli örnek perfüzyonu ve düşük seviyede kesmeyi sağlayan yeni tip biyoreaktörlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Martin ve ark., 2004).

### Biyoproses

Hücre çoğalması, hücrelerin farklılaşması, ürün yapımı ve atık değerlendirilmesi olmak üzere dört aşamadır. *In vitro* et biyoprosesleri, kas hücrelerinin çoğaldığı ve farklılaştığı ortamın karmaşık olmasından dolayı mevcut

biyoproseslerden ayrılmaktadır (Schnitzler ve ark., 2016).

Döner duvarlı kap biyoreaktörü, merkezkaç kuvveti, sürüklenme kuvveti ve yerçekimi kuvvetini dengeleyen bir hızda döner. Üç boyutlu kültür besiyerine daldırılarak, mevcut *in vivo* ile karşılaştırılabilir özellikte dokunun geliştirilmesine yardımcı olur. İskele tabanlı et üretiminde kullanılan bir başka biyoreaktör tipi de doğrudan perfüzyon biyoreaktörleridir. Bu biyoreaktör, yüksek kütle aktarım oranına ve önemli ölçüde düşük seviyede kesme gerilim özelliğine sahiptir (Carrier ve ark., 2002).

### Kendini Düzenleme Yöntemi

*In vitro* et üretilmesine yönelik yüksek düzeyde yapılandırılmış eksplante hayvan kas dokusunun kullanıldığı yöntemdir. Kendini düzenleme yöntemi kas dokusunun oluşturulmasını veya mevcut kas dokusunun *in vitro* çoğalmasını içerir (Benjaminson ve ark., 2002).

Benjaminson ve ark. (2002), homolog yetişkin kas dokusu hücrelerinin bir substrata bağlanarak gelişmelerini araştırmışlardır. Bu amaçla yaptıkları çalışmada Japon balığı dokusu dilimlerini pelet yapımı için doğramış ve santrifüjlemişlerdir. Daha sonra bu besin karışımını petri kaplarına koyarak 7 gün boyunca gelişmeleri için bırakmışlardır. Benjaminson ve ark. (2002) fetal sığır serumu yerine olası alternatiflerin belirlenmesi amacıyla bir dizi ortamın (cenin sığır serumu, balık unu özütü ve birkaç mantar özütü dahil) her birinin eksplant kas dokusunun gelişmesine nasıl yardımcı olduklarını incelemişler. 2 hafta sonra 48 kültürün %81'inde petri kabına doku yapışmasının, %63'ünde kendiliğinden iyileşmenin ve %74'ünde hücre çoğalmasının meydana geldiği görülmüştür. Besleyici ortam olarak fetal sığır serumunun kullanılması ile eksplante edilen dokuda yaklaşık olarak %14 oranında, maitake mantar özünün kullanılması ile %13'ten fazla artış tespit edilmiştir. Japon balığı iskelet kası hücrelerini içeren kültürde bir hafta sonra, eksplantların yüzey alanının %79 oranında artış gösterdiği saptanmıştır. Taze balık filetolarına benzerlik gösteren eksplantlar ve yeni oluşan doku zeytinyağı ve sarımsakla marine edilmesi işleminden sonra duyuusal bir panele değerlendirme yapılmak üzere gönderilmeden önce derin yağda kızartılmıştır. Duyusal panel sonucunda, eksplantların ve yeni gelişen dokunun yenilebilir nitelikte görünümüne ve kokuya sahip olduğu bildirilmiştir (Bhat ve ark., 2020).

Li ve ark. (2015) tarafından domuz kas hücrelerinin izolasyonu ve çoğalması için bir protokol oluşturulmuştur. Buna göre; araştırmacılar ilk olarak kasları küçük parçalara ayırarak, hücrelerin izole edilmesi ve peletlerin yapımı için santrifüjlemişlerdir. Daha sonra bunları, penisilin-streptomisin içeren fetal sığır serumlu gelişme ve at serumlu farklılaştırma ortamlarında çoğalmak üzere petri kaplarına yerleştirmişlerdir. Bir hafta sonunda yaklaşık %70 oranında artışın olduğunu tespit etmişlerdir. Son zamanlarda Wang ve ark. (2020), keçi iskelet kası hücrelerinin fetal sığır serumu içerikli gelişme ve at serumu içerikli farklılaşma ortamında yaklaşık %80 oranında artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

### 3D /4D (Üç/Dört Boyutlu) Organ veya Biyo-Baskı Yöntemi

Üç boyutlu (3D) ya da dört boyutlu (4D) organ veya biyobaskı geleneksel baskı ilkelerine dayanmaktadır (Şekil 3). Biyo-ürünün prototipinin oluşturulması için bilgisayar destekli tasarım yazılımı kullanılmaktadır. Hücreler, bilgisayar destekli tasarım yazılımına göre jellerin üzerine püskürtülür ve kültürleme esnasında hücreler, kan iletmek için temel hücresel yapıya ve vaskülarizasyona sahip olabilen biyo-ürünü oluşturmak üzere birleşir (Boland ve ark., 2003; Hopkins ve Dacey, 2008). 3D biyobaskı, rejeneratif doku ve organ terapötik uygulamaları için fonksiyonel ve anatomik olarak özdeş dokuların veya organların oluşturulmasında en etkili yöntemlerden biridir. Karşılaştırılabilir teknolojiyi kullanan 4D baskısı, 3D baskısını genişletir ve zaman içinde başka bir değişiklik boyutu ekler. Hedef organ veya dokular nem ve sıcaklığa duyarlıdır. Bu yöntem

kas, kemik ve kardiyovasküler dokuların onarılmasında kullanılmaktadır (Javaid ve Haleem, 2019).

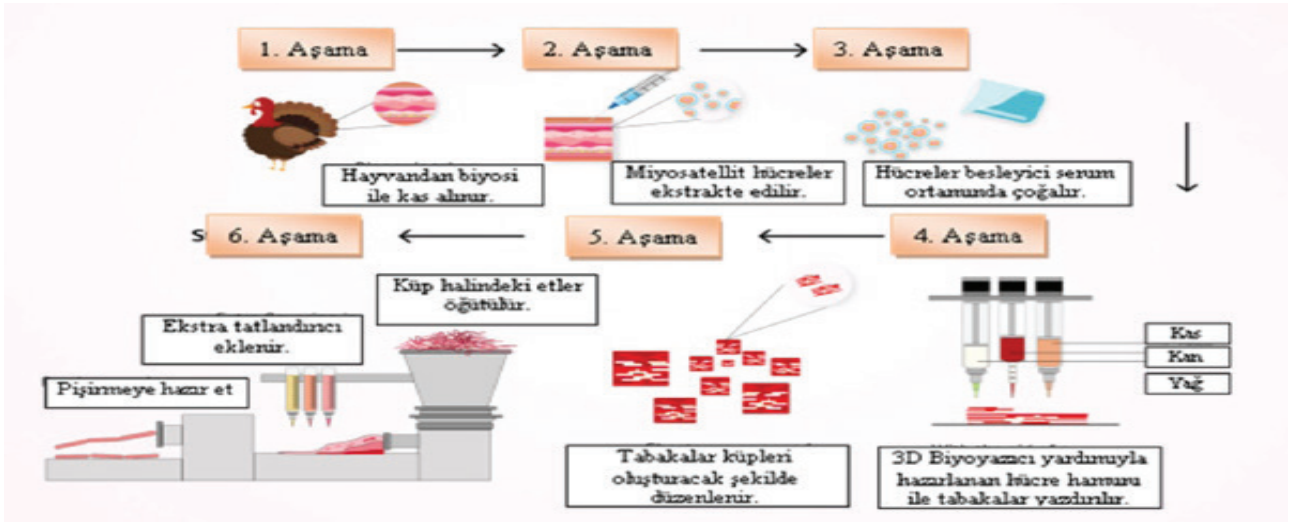
2021 yılında Aleph Farms ile İsrail Teknoloji Enstitüsü Technion işbirliğinde 3D biyobaskı yöntemi ile dünyanın ilk biftek eti başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Bu etin normal et yapısında benzerlik gösteren yağı içerdiği, yumuşak ve sulu özellikte olduğu iddia edilmektedir. Ayrıca şirket tarafından gelecekte 3D biyobaskı teknolojisinin kullanımı ile her türlü etin üretilebileceği belirtilmektedir (Poinski, 2021).

### Biyofotonik Yöntem

Partiküllerin birbirine bağlanması için lazer ışığının kullanıldığı yeni bir yöntemdir. Malzemenin biriktirilebileceği ve ışık kaybolana kadar bir arada tutulabileceği özellikteki forma sahip olan "optik madde" üretilir. Bu malzeme birleştirilerek yeni bir katı yapı oluşturabilir. Işığın bu mekanik özelliği hala tam olarak anlaşılammıştır. Yeni teknoloji ile diğer tekniklere kıyasla kas hücreleri uyum sağladığı takdirde et üretilebilir ve yağ gibi özelliklerin kolayca aktarımı mümkün olabilir. Biyofotonik yöntem, geleneksel iskele teknikleri yerine hücreleri tutmak için kullanılacak alternatif yöntemdir. Bugüne kadar biyofotonik yöntem kullanılarak kırmızı kan hücreleri ve hamster yumurtalıkları oluşturulmuştur (Hopkins ve Dacey, 2008).

### Nanoteknoloji Yöntemi

Moleküllerin hassas bir şekilde bir araya getirilmesi sonucunda hemen hemen her malzemenin oluşturulması ile atomik düzeyde maddenin manipüle edilerek molekül boyutta bir robot tasarlanması amaçlanmaktadır. Finansal



Şekil 3. 3D/4D organ veya biyo-baskı yöntemi (Mateti ve ark., 2022).

ve teknolojik olarak mümkün olmasa da yapay et üretimi için geçerli olabilir. Nanoteknoloji ile besin içeriği azaltılmadan etin raf ömrü uzatılabilir (Das ve ark., 2020). Doğurganlığın artırılmasına yönelik hayvanlara kadar uzanabilen manyetik nanoseleksiyon uygulamaları ile canlı sperm izole edilerek seçici üreme sağlanabilir (Durfey ve ark., 2019). Anti-mikrobiyal partiküllerle birleştirilmiş nano cihazların kullanılması ile et ürünlerinin orijinalliği ve son kullanma tarihi izlenebilir ve güvenli standartlar oluşturulabilir (Sikka, 2020).

### Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) ve Klonlanmış Hayvanlar

GDO'lar, kültür yapay etin sınıflandırılmasında dikkate alınmaktadır. Benzerliklerine rağmen, genomları laboratuvar ortamında değiştirilen hayvanlar yapay olarak kabul edilmektedir. Klonlama, özdeş torunların üretilmesine yönelik olarak bilimsel desteklenen bir yaklaşımdır. İnsan tarafından yapılan bir prosedür olduğunda et yapay olarak görülebilmektedir. Hayvanların genetik modifikasyonu ile geleneksel et üretiminden kaynaklanan çevresel etki azaltılabilir (Eenennaam ve Louise, 2017). Teorik olarak uygulanabilir ve test edilmiş olmasına rağmen, bireylerin beslenmesinde genetiği değiştirilmiş hiçbir hayvanın tüketimine izin verilmemiştir.

Hayvan klonlaması ile spesifik genotipe sahip hayvan sayısının artırılması ve karbon salınımının azaltılması neticesinde mevcut genetik özelliğin yayılması sağlanır (Petetin, 2012). İyi genetik özelliğe sahip hayvanların klonlanması ile genetik manipülasyon gibi diğer stratejiler tamamlanabilir. Ancak hayvanların korunması bakımından bazı olumsuz sonuçlara neden olabilir. Bununla birlikte klonlama işlemi, büyük/anormal yavru sendromu ve doğrudan klonlama teknolojilerinden kaynaklanan erken ölümler gibi bazı edinimsel deformitelere neden olduğundan dolayı da kusursuz değildir (Verzijden ve Lawyers, 2012).

### BİTKİ BAZLI KAYNAKLARDAN ELDE EDİLEN ET ALTERNATİFLERİ (VEGAN ET)

#### Quorn

Toprakta bulunan *Fusarium venenatum* mantarı olarak adlandırılan mikoproteinden yapılır. Mantar şekerle fermente edilir ve çeşitli quorn öğelerinde kullanılan bir hamur elde etmek için santrifüjlenir. Quorn, kan kolesterol

seviyelerini düşürmeye ve enerji tüketimini azaltmaya yardımcı olmaktadır. Quorn yiyecekler arasında köfte, pürzola, biftek, hamburger ve lazanya gibi hazır gıdaların vegan alternatifleri bulunur. Diğer vejetaryen protein kaynaklarıyla karşılaştırıldığında, kolesterol içermez, düşük oranda doymuş yağ asidi ve lif içeriğine sahiptirler. Ayrıca mikoprotein amino asit içeriği, diğer vejetaryen ve hayvansal proteinler ile benzerlik göstermektedir (Denny ve ark., 2008; Joshi ve Kumar, 2015).

#### Soya Eti

Soya proteini içeren ürünler, yüksek besin değerleri ve çeşitliliklerinin yanında düşük fiyatları nedeniyle popüler ürünlerdir. Soya proteini konsantresi ve soya proteini izolatu olmak üzere iki önemli bileşik vardır. Soya proteini konsantresi, kuru ağırlık bazında en az %65 protein içerikli iken soya protein izolatu ise en az %90 protein içeriğine sahiptir. Soya etinde bulunan arzu edilmeyen besin maddelerinin uzaklaştırılması amacıyla soya proteini, 30 °C'de su ile ekstrüderde yaklaşık 3 saat süreyle birleştirilir. Malzeme hamur haline getirilir ve ısıtılır. Kabuk kısmın ortadan kaldırılması ve daha sonra kurutulmuş kabarık halde katı yapının elde edilmesi için denatüre edilir. Doku kalitesinin artırılması amacıyla proses bölümündeki sıcaklık değerinin 70 °C civarında 5-8 saat boyunca yüksek tutulması oldukça önemlidir (Riaz, 1999).

#### Tempeh

En çok bilinen fermente gıdadır. Besin maddeleri ve biyoaktif bileşikler bakımından yüksek değere sahiptir. Tempehin baskın bileşeni *Rhizopus oligosporus* olmasına rağmen mayaları, küfleri, Gram negatif bakterileri ve laktik asit bakterilerini içeren karışık bir fermantasyon ürünüdür. Tempeh, soya fasulyelerinin ıslatılması ve pişirilmesi daha sonra da mantarın ilave edilmesiyle üretilir. 24 saat sonra cevizli bir tat özelliğindeki köfteler ve diğer et alternatifleri çiğnenebilir bir mantar dokusuna sahip olmaktadır. Tempeh'in protein içeriği fermantasyon sırasında önemli ölçüde artış göstermektedir. Bu durum tempehi, fermente edilmemiş soya fasulyesine göre daha sindirilebilir hale getirmektedir (Nout ve Kiers, 2005).

#### Tofu

Kalsiyum, demir ve protein gibi birçok besin öğesini içeren soya fasulyesinden yapılan bitki bazlı bir et

alternatifidir. Tofu, soya sütünün  $\text{CaSO}_4$  veya  $\text{MgCl}_2$  ile pıhtılaştırılmasıyla yapılır. Tofu içeriğinin %8'i protein, %4-5'i yağ, %2'si karbonhidrat ve taze ağırlık bazında %1'i diyet lifinden oluşmaktadır. (Stanojevic ve ark., 2010). Tofuya besinsel ve fizyolojik fayda sağlamak amacıyla vitaminler ve mineral maddeler ilave edilebilir (Azadbakht ve ark., 2007).

### **Kinema**

Fermantasyon sırasında kullanılan *Bacillus* mantarı nedeniyle alkali ve yapışkan özellikte fermente bir gıdadır. Kuru ağırlık bazında kinemanın; %7'si kül, %17'si yağ, %28'si karbonhidrat ve %48'i proteinden oluşmaktadır (Wang ve Murphy, 1994).

### **Olgunlaşmamış Yeşil Soya Fasulyesi**

Baklalar, tuz ve diğer baharatlarla servis edilmeden önce buharda pişirilir. Olgunlaşmamış yeşil soya fasulyesinin %73'i su, %12'si protein, %9'u karbonhidrat ve %5'i yağdır. 100 gramı 121 kalori değerine sahiptir. Protein, diyet lifi, folat ve mangan gibi mineral maddeler ile K vitamini bakımından zengindir. Yağ bileşiminde 361 mg omega-3 yağ asidi ve 1794 mg omega-6 yağ asidi bulunur (Johnson ve ark., 2000). Yeşil soya fasulyesi kabukları olgunlaşmadan önce (çiçek açmasından yaklaşık 35-40 gün sonra) hasat edilir ve kaynatılır. Daha sonra buharda veya mikrodalgada pişirilir. Kaynatmadan veya buharda pişirmeden önce kapsüllerin uçları kesilir. Soya fasulyesi baklaları pişirildikten sonra lezzeti arttırmak amacıyla kaynar suda eritilmiş tuz ilave edilir. Olgunlaşmamış yeşil soya fasulyesinin 10 saat içerisinde tadı bozulacağından hasat edildiği gün tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Baklalar, taze olarak kalması ve renk değişiminin önlenmesi için nemli olmalıdır (Shanmugasundaram, 1991).

### **Diğer Çeşitler**

Tatlı acı bakla tohumları vegan et alternatifleri olabilir. Etsiz (Hollanda ürünü), çeşitli form, tat ve renklerde acı bakla veya buğdaydan oluşmaktadır (European Commission, 2016). Acı bakladan yapılan birçok et alternatifi mevcuttur. Amerika Birleşik Devletleri'nde, risofu (İtalyanca pirinç, riso ve tofu kelimesinden oluşan bir terim) adı verilen pirinç burgerleri ve sosisleri, Tayland'ın pirinç bazlı tofu üreten Shan bölgesinden esinlenmiştir (Schmidinger, 2012). Yenilebilir yağlar, koyulaştırıcı maddeler, tahıllar,

pirinç ve alglerin kombinasyonu, vegan et alternatiflerinin habercisidir. Örneğin Almanlar remis algen üretmektedir. Başka bir örnek ise Hindistan Yarımadası'nda inek veya manda sütünden üretilen besin açısından zengin paneer veya Hint süzme peyniridir (Mateti ve ark., 2022).

### **Bitki Bazlı Et Alternatifleri Üretim Yöntemleri**

#### **Termo-Ekstrüzyon Yöntemi**

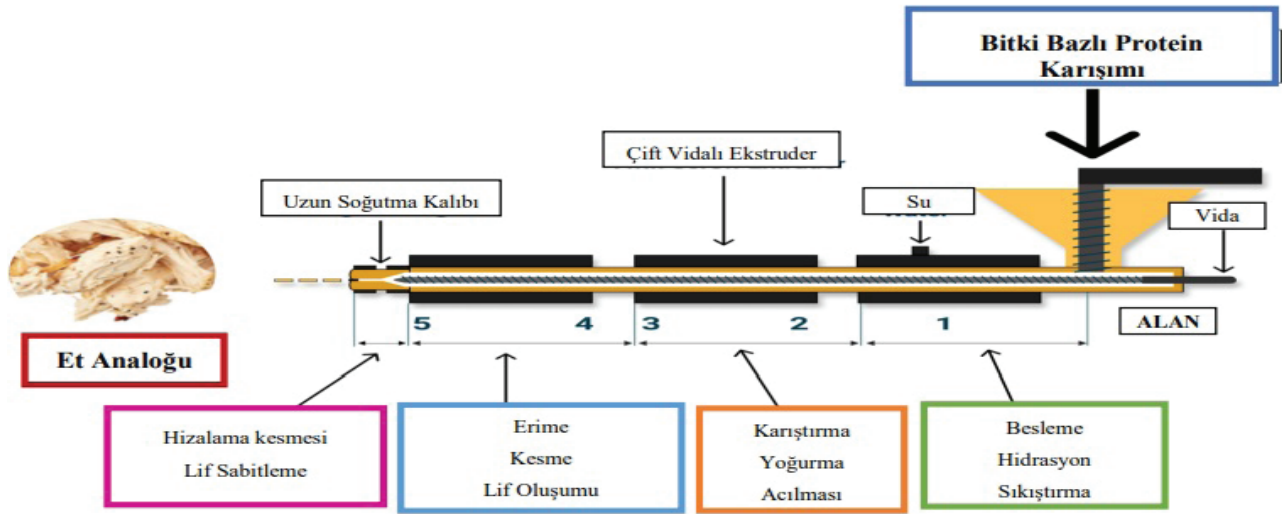
İşleme teknikleri, gerçek et hissine sahip bitki bazlı veya tam kaslı et alternatiflerinin oluşturulmasını amaçlamaktadır (Mattice ve Marangoni, 2020). Termo-ekstrüzyon yöntemi; düşük maliyeti, enerji verimliliği, uyarlanabilirliği ve mükemmel üretkenliği nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Bitki proteinlerinin daha sonra et alternatif ürünleri için yapılandırılmış fibrillere dönüştürülmesinde kullanılan birincil işleme yöntemidir. Termo-ekstrüzyon, düşük, orta ve yüksek nemli olabilmektedir (Akdoğan, 1999).

Termo-ekstrüzyon yöntemi; genleştirme, şekillendirme, ısıtma, hava giderme, homojenleştirme, sıkıştırma, kesme, hidrasyon ve karıştırmayı içeren çok amaçlı bir prosedürdür (Şekil 4). Ekstrüzyon, yüksek sıcaklık (140-180 °C) ve orta-yüksek nem konsantrasyon değerlerinde (%40-80) proteinin tekstüre edilmesi ve sonrasında lif yapılarının oluşturulmasını sağlayan kesme işlemi ile gerçekleştirilmektedir. Bu koşullar, ürünün genleşmesi ve protein jelleşmesi, hamur şekli, yağ emülsifikasyonu ve partikülün yeniden yapılandırılması üzerinde hassas bir rol oynamaktadır. Ekstrüzyon işlemi, protein bileşenlerinin mikro düzeyde pıhtılaşması ve fibrilasyonuyla sonuçlanmaktadır (Wild ve ark., 2014).

#### **Yüksek Sıcaklıkta Konik Hücre Kesimi Yöntemi**

Yüksek sıcaklıkta konik hücre kesimi yönteminde, hareketli bir taban konisine sahip ve iç içe geçmiş konilerden oluşan bir cihaz kullanılmaktadır. İki koni arasındaki boşluk, ısıtma esnasında (95-140 °C aralığında değişen sıcaklıklarda) buhar çıkışının önlenmesi amacıyla sızdırmaz hale getirilmiştir (Krintiras ve ark., 2016). Bu yöntem ile bezelye proteini-buğday gluteni ve soya proteini-buğday glutenini birleştirerek fibriller üretilir. Elde edilen karışım 15 dakika ısıtılır ve daha sonra 25 °C'ye soğutulur. Gıdalar, yapısal olarak kararlı liflerin oluşturulması amacıyla plastik torbalar içinde oda sıcaklığında en az 1 saat bekletilir. 110 °C ve 120 °C'de işlenen soya proteini karışımları, tavuk etine eşdeğer





Şekil 4. Etin termo-ekstrüzyon işlemi (Mateti ve ark., 2022).

bir mekanik dayanıklılığa sahipken, 140 °C'de işlenen bezelye proteini karışımları ise soya proteini karışımlarıyla kıyaslanabilir güçtedir (Schreuders ve ark., 2019).

#### YAPAY ET ENDÜSTRİSİNİN GELECEĞİ

Yapay et üreticileri, etin besin ögesi içeriği ve miktarının istenildiği gibi değiştirilebileceğini savunsalar da yapay et üretimi konusunda kesinleşmiş prosedürler mevcut değildir. Normalde etin yapısında bulunan makro ve mikro besin öğelerinin *in vitro* olarak nasıl oluşturulacağı tam olarak bilinmemektedir (Chriki ve Hocquette, 2020).

Kas hücreleri tarafından sentezlenemeyen bazı besin öğelerinin *in vitro* etin büyüme ortamında sentezlenmesi mümkündür. Bu besin öğelerinin en önemlilerinden biri olan B<sub>12</sub> vitamini, bağırsakta bulunan bakteriler tarafından sentezlenmekte ve sadece geleneksel yöntemle üretilen etin yapısında bulunmaktadır. Ancak dışarıdan B<sub>12</sub> vitamini takviyesi yapılarak *in vitro* et ürünün B<sub>12</sub> vitamini içermesi sağlanabilir. Aynı şekilde normal ette myoglobin ve hemoglobinin yapısında bulunan demirin de kültür ortamına eklenmesi gerekmektedir (Aisen ve ark., 2001).

Sağlıklı beslenme açısından oldukça önemli olan hayvansal kaynaklı besinler, zoonoz hastalıklar açısından da risk taşımaktadır. Zoonoz hastalıklar, omurgalı hayvanlardan insanlara doğal olarak bulaşabilen bir hastalık veya enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bazıları direkt hayvanlar yoluyla, bazıları ise hayvansal kaynaklı besinlerin tüketilmesi yoluyla bulaşan 200'den fazla zoonoz bulunmaktadır. (WHO, 2020). Yapay et

üretim sürecinde hayvanlarla aktif temas olmaması, zoonozlara karşı koruma sağlamaktadır (Hocquette ve ark., 2015).

Hayvansal kaynaklı besinlerin hazırlanması, pişirilmesi veya saklanması sırasında ortaya çıkabilecek fiziksel, kimyasal ve mikrobiyolojik tehlikeler de bulunmaktadır. Bu nedenle tüm üretim süreçlerinde gıda güvenliğinin sağlanması oldukça büyük önem arz etmektedir (Erkmen, 2010). Geleneksel et üretim süreci ile karşılaştırıldığında, laboratuvar koşullarında kontrollü ortamda üretilen yapay etin sahip olduğu mikrobiyal risk oldukça azdır. Dolayısıyla yapay etin hayvansal orijinli besinlerden kaynaklanan hastalıkların önüne geçebileceğini veya azaltabileceğini söylemek mümkündür (Pandurangan ve Kim, 2015).

Canlı kök hücrelerin laboratuvar ortamında çoğaltılması sonucu yapay etin elde edilmesi, geleneksel üretim tekniklerine göre daha kısa sürmektedir (Bhat ve ark., 2017). Bu amaçla fetal sığır serumu, büyüme faktörü, hormon ve enzim gibi çok çeşitli biyolojik yapılara ihtiyaç duyulmakta; ancak elde edilen yapay et geleneksel etin sahip olduğu damar, yağ ve kas dokusu gibi yapılarına tam olarak benzerlik göstermemektedir (Ben-Arye ve Levenberg, 2019). Lezzet açısından değerlendirildiğinde ise yapay et geleneksel etin yerine geçebilecek durumda değildir (Zhang ve ark., 2020). Ayrıca yapay et teknolojisi uygulamalarında yetişmiş uzmanlar, gelişmiş donanımlı laboratuvarlar ve özel biyolojik içeriklere ihtiyaç duyulmaktadır (Muslu, 2021). *In vitro* et üretimi üzerine yapılan çalışmalar her ne kadar yüksek maliyetler



gerektirse de, laboratuvarlarda küçük çaplı üretimler gerçekleştirilmiştir. Ancak büyük ölçekli seri üretime geçilmesi halinde ürünün fiyatlandırılması ve piyasaya çıkış sürelerinin nasıl olacağı henüz belirsizliğini koruyan konulardır (Mateti ve ark., 2022).

Geleneksel et üretim prosesinde boynuz, tırnak, deri ve kemik gibi insan beslenmesinde kullanılmayan, ancak çok çeşitli amaçlarla kullanılmak üzere geri dönüştürülebilir yan ürünler ortaya çıkmaktadır (Ashley, 2002). Yapay et üretimi kas dokusunun çoğaltılmasına dayanan bir yöntem olduğundan hem geleneksel et üretim prosesindeki hem de hayvanların bakım sürecinde bazı atıklar oluşmamaktadır (Datar ve Betti, 2010).

Yapay et üretiminde kas hücrelerinin çoğaldığı ve geliştiği kültür ortamındaki oksijen, ete kırmızı rengini veren myoglobinin oluşumunu engellediğinden doğal ete göre renksiz bir yapıya sahiptir. Bu nedenle yapay etin, miyoglobin ve hemoglobin proteinlerinde bulunan heme şeker pancarı ve safran gibi doğal renklendiricilerin ilave edilmesi ile besin değerinin artırılmasının yanında renklendirilmesi de mümkün olmaktadır (Bhat ve ark., 2015). Tekstürün oluşmaması da diğer bir dezavantaj olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla yapay ete transglutaminaz ilavesi yapılabilmektedir. Ancak sıradışı kimyasal bağlar ve farklı aminoasitler oluşturmasının yanında sindirilememesi de insan sağlığı üzerinde bir takım olumsuz etkilere neden olabilmektedir (Mateti ve ark., 2022).

Yapay et kavramı, üretim teknolojisi ve ismi açısından tüketiciler tarafından henüz tam olarak kabul edilmiş değildir. Genel olarak yapay ifadesi, besinlerin doğallıktan uzak olduğunu simgelediğinden tüketilme ihtimalini azaltmaktadır. Bu nedenle yapay et tüketiminin sürdürülebilirliği için lezzet açısından geleneksel ete benzemesi ve tüketici algısı açısından da olumsuz düşüncelerin ortadan kaldırılması gerekmektedir (Verbeke ve ark., 2015; Siegrist ve ark., 2018).

Sürdürülebilir diyetlerin ekonomik, ulaşılabilir ve tüketilebilir olmaları en önemli özellikleridir. Tüketimi şu an için oldukça sınırlı olan yapay et, ilk defa 2013 yılında hamburger köftesi olarak tüketime sunulmuştur. Eti tüketen kişiler, geleneksel etin dokusuna tam olarak benzerlik göstermese de tüketilebilir olduğunu belirtmişler; böylelikle yapay etin tüketilebileceği fikri güç kazanmıştır (Fountain, 2013). Ayrıca üretici firma tarafından, yaklaşık 325.000 dolar olan maliyetin 2050

yılına kadar düşeceği bildirilmektedir (Fountain, 2013; Stephens ve ark., 2018).

Kültür ortamında üretilmiş olan yapay etin, metan gazı emisyonunun azaltılmasında potansiyel faydası bulunmaktadır. Hayvan yetiştiriciliğinde çevreye metan, karbondioksit ve azot oksit gibi gazlar salınırken; yapay et üretiminde fosil enerji kullanımı sonucu karbondioksit gazı salınmaktadır. Dolayısıyla başta metan gazı olmak üzere hayvansal kökenli sera gazlarının salınımının azalması ile küresel ısınmanın da önleneceği belirtilmektedir (Mateti ve ark., 2022).

Günümüzde Hollanda, Amerika, İsrail ve Singapur gibi bazı ülkeler tarafından yapay et üretimi ile ilgili ciddi boyutta çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Ancak üretim maliyetleri ve satış fiyatı henüz herkes tarafından kolaylıkla tüketilebilecek düzeyde değildir. Yapılan çalışmalar, 2025 yılında yapay et fiyatlarının satın alınabilecek seviyeye geleceğini; 2030 yılında ise dünya et piyasasının %10'luk bir kısmını yapay etin oluşturacağını göstermektedir (Bryant ve ark., 2020). Ancak yapay et üretimi açısından yüksek üretim maliyetlerinin yanında tüketiciler tarafından kabul edilmesi, henüz bilinmeyen riskler, duyuşal özelliklerdeki farklılıklar ve hayvan yetiştiriciliğinin azalması sonucunda muhtemel istihdam kaybı gibi bazı engeller olduğunu söylemek mümkündür (Bhat ve ark., 2020). Geleneksel et üretiminde çiftlik hayvanlarının kesimi ve diğer ürünlerin elde edilmesi sırasında hayvan refahının gözetilmemesi de diğer bir etik kaygıdır (Yetim ve Tekiner, 2020). Yapay et üretim teknolojisi ile her ne kadar hayvan kesiminin önüne geçilerek hayvan refahı sağlanmış olsa da, üretim amacıyla hayvanlardan canlı hücre alınmasının etik olmadığı da düşünülmektedir (Gross, 2014). Diğer bir endişe verici durum ise bu teknolojinin geliştirilmesiyle ilerleyen zamanlarda insan hücrelerinin de kültürlenerek çoğaltılabilme riskidir (Schneider, 2013).

Dini boyutta değerlendirmek gerekirse; Yahudiler, Müslümanlar ve Hindular da dahil olmak üzere birçok dini toplulukta yapay et ile ilgili tartışmalar devam etmektedir. Yahudilerin bazıları kök hücreler koşer bir hayvandan alındığı takdirde yapay etin dinen tüketilebilir olduğu görüşünü savunurken bazıları ise hiç bir koşulda kabul etmemektedir. Hinduizme göre yapay et üretimi hayvanlara saygısızlık olarak nitelendirilmektedir. İslam inancına göre ise canlı hayvandan alınan bir parçanın yenmesinin helal olmayacağı düşüncesi yapay etin

geleceği ile ilgili diğer bir tartışma konusudur (Chriki ve Hocquette, 2020). Diyanet İşleri Başkanlığı; yapay etin helal olma durumunun, *in vitro* olarak çoğaltılan hücrelerin canlı veya ölmüş bir hayvandan alınmış olmasına göre farklılık gösterebileceğini bildirmiştir. Ancak konuyla ilgili henüz net bir karara varılmamıştır (Yetim ve Tekiner, 2020). Yahudiler, Müslümanlar ve Hindular da dahil olmak üzere kültür etinin tüketici tarafından kabulünün değerlendirilmesine yönelik olarak 3.030 kişinin katıldığı bir anket çalışmasının sonucunda, katılımcıların çoğunun kültür etini tüketmeye istekli olduğu tespit edilmiştir (Bryant ve ark., 2020).

Yapay et üretim teknolojisinin hayvancılık sektörünün neden olduğu birçok problemi çözeceği iddia edilmesine rağmen günümüzde sorunların çözümüne henüz bir katkı sağlamamıştır. Klonlama teknolojisi, GDO'lu çiftlik hayvanları ve *in vitro* etleri ticarileştirmenin önünde hala önemli teknolojik ve/veya düzenleyici engellerdir. Yapay et üretim teknolojisi, verimlilik bakımından geleneksel yöntemle üretilen et ile benzerlik gösterse de toplumların yapay et tüketimine geçip geçmeyeceği konusunda henüz kesin bir bilgi bulunmamaktadır (Bryant ve ark., 2020). Ayrıca dünya genelinde yapay et hakkında hazırlanmış kapsamlı mevzuatlar da yer almamaktadır (Stephens ve ark., 2018).

## SONUÇ

Yapay et üretimi fikri uzun zamandır mevcut olmasına rağmen, teknolojik gelişmelere paralel olarak son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Yapay et üretiminin ilerleyen zamanlarda geleneksel et üretimine karşı güçlü bir alternatif olacağı öngörülmektedir. Yapay et üretim teknolojileri özellikle insan sağlığı, çevresel sürdürülebilirlik ve hayvan refahı gibi tüketici beklentilerinin karşılanmasında hızlı bir ilerleme göstermektedir. Yenilebilir kalitede küçük ölçekli kültür eti üretim süreci kısa zamanda gerçekleşse de büyük ölçekli üretime geçişin zaman alması muhtemeldir. Dünya nüfusunun artması ile ortaya çıkacak et arz-talep dengesizliğinin mevcut geleneksel et üretimi yoluyla giderilmesi mümkün değildir. Bu nedenle tüketicilerin ihtiyacının karşılanması amacıyla çevre dostu ve hastalıklardan arındırılmış yapay kültür eti üretimi teşvik edilmelidir.

Piyasada tüketicilerin genel olarak erişebildiği bitki proteinlerinden yapılan et alternatifleri bulunmaktadır. Buna rağmen üretiminde ileri laboratuvar koşullarına

ihtiyaç duyulması, maliyetinin yüksek olması, üretim hacminin azlığı ve lezzet kriterlerinin tam sağlanamaması nedeniyle kültür etinin tüketimi yaygın değildir. Aynı zamanda net olarak belirlenmiş üretim protokollerinin olmaması, gerekli mevzuat ve politikaların bulunmaması, geniş sosyokültürel araştırmaların yapılmamış olması ile üretim maliyetlerinin ön planda olması kültür etine karşı güven sorununu devam ettirmektedir. Yapay et üretim teknolojisindeki gelişmelerin sağladığı bir çok avantajın yanında tehlikeli durumlara yol açma olasılığı da vardır. Nitekim yapay et üretim teknolojisinin kötü amaçlı kullanımı sonucu insan kas dokusunun kültürlenmesi, insan eti yenmesine (kanibalizm: yamyamlık) neden olabilecektir. Bu açıdan risk teşkil etmektedir.

Tüketici tercihi bakımından henüz açıklanamamış diğer bir durum ise yapay etin dini açıdan ele alınmasıdır. Dini konuda duyulan endişeler henüz tam olarak giderilememiş olsa da; yapay et üretiminin artması, market raflarında yerini alması ve restoranlarda tüketilir hale gelmesi ile bu durumun da netleşeceği kanısı mevcuttur.

Yapay etin sürdürülebilir besin kaynakları arasında gösterilebilmesi için üretim prosedürlerinin belirlenmesi, lezzet kriterlerinin sağlanması, risk analizlerinin yapılması ve gerekli yasal mevzuatların oluşturulması önem arz etmektedir. Halihazırda kültür etinin fiyatının yüksek olmasına karşın ilerleyen zamanlarda üretim maliyetlerinin azalacağı tahmin edilmektedir. Tüketiciler tarafından ürünün tercih edilmesinde ürün odaklı reklamcılık ve üretim sürecinin avantajlarının da vurgulanması etkili olacaktır. Büyük ölçekli yapay et endüstrisinin, geleneksel et üretiminin yerini almasında kamu otoritesinin yatırım ve araştırma desteğine ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Aisen, P., Enns, C. & Wessling-Resnick, M. (2001). Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*, 33, 940-959.
- Akdogan, H. (1999). High moisture food extrusion. *Int J Food Sci Technol*, 34 (3), 195-207.
- Akkaya, E. (2019). Farklı Enzim Uygulamalarının ve Olgunlaştırma Yöntemlerinin Sığır Etlerinin Kalite Parametreleri ve Raf Ömrü Üzerine Etkisi. Istanbul, Turkey, Thesis of PhD, IU, diss.

- Ashley, B. (2002). Edible weights of wildlife species used for country food in the Northwest Territories and Nunavut. Wildlife and Fisheries Division, Department of Resources, Wildlife and Economic Development, Government of the Northwest Territories Yellowknife, NWT, 2002, Manuscript Report No. 138, 1-82.
- Aswad, H., Jalabert, A. & Rome, S. (2016). Depleting extracellular vesicles from fetal bovine serum alters proliferation and differentiation of skeletal muscle cells in vitro. *BMC Biotechnol*, 16 (1), 1-12.
- Atay, O., Gökdal, Ö., Aygün, T. & Ülker, H. (2004). Aydın İli Çine İlçesinde Kırmızı Et Tüketim Alışkanlıkları. 4. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Isparta, 2004, 348-354.
- Azadbakht, L., Kimiagar, M., Mehrabi, Y., Esmailzadeh, A., Padyab, M., Hu, F. B. & Willett, W. C. (2007). Soy inclusion in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 85 (3), 735-741.
- Ben-Arye, T. & Levenberg, S. (2019). Tissue engineering for clean meat production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 46.
- Benjaminson, M. A., Gilchrist, J. A. & Lorenz, M. (2002). In vitro edible muscle protein production system (MPPS): Stage 1, fish. *Acta Astronaut*, 51 (12), 879-889.
- Bhat, Z. F., Kumar, S. & Fayaz, H. (2015). In vitro meat production: Challenges and benefits over conventional meat production. *J Integr Agric*, 14 (2), 241-248.
- Bhat, Z. F., Kumar, S. & Bhat, H. F. (2017). In vitro meat: A future animal-free harvest. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57 (4), 782-789.
- Bhat, Z. F., Bhat, H. & Kumar, S. (2020). Cultured meat-A humane meat production system. In, *Principles of Tissue Engineering*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier; 2020. pp. 1369-1388.
- Bingöl, E. B. & Bostan, K. (2012). Bir gıda katkı maddesi olarak laktatların et ve et ürünlerinde kullanımı. *Istanbul Univ Vet Fak Derg*, 38 (1), 79-88.
- Boland, T., Mironov, V., Gutowska, A., Roth, E. A. & Markwald, R. R. (2003). Cell and organ printing 2: Fusion of cell aggregates in three-dimensional gels. *Anat Rec Part A*, 272 (2), 497-502.
- Bryant, C., Szejda, K., Parekh, N., Desphande, V. & Tse B. (2020). A survey of consumer perceptions of plant-based and clean meat in the USA, India, and China. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3, 11.
- Carrier, R. L., Rupnick, M., Langer, R., Schoen, F. J., Freed, L. E. & Vunjak-Novakovic, G. (2002). Perfusion improves tissue architecture of engineered cardiac muscle. *Tissue Eng*, 8 (2), 175-188.
- Choudhury, D., Tseng, T. W. & Swartz, E. (2020). The Business of Cultured Meat. *Trends Biotechnol*, 38 (6), 573-577.
- Chriki, S. & Hocquette, J. F. (2020). The myth of cultured meat: a review. *Front Nutr*, 7, 7.
- Das, A. K., Nanda, P. K., Bandyopadhyay, S., Banerjee, R., Biswas, S. & McClements, D. J. (2020). Application of nanoemulsion-based approaches for improving the quality and safety of muscle foods: A comprehensive review. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 19 (5), 2677-2700.
- Datar, I. & Betti, M. (2010). Possibilities for an in vitro meat production system. *Innov Food Sci Emerg Technol*, 11 (1), 13-22.
- Dennis, R. G. & Kosnik, P. E. (2000). Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 36 (5), 327-335.
- Denny, A., Aisbitt, B. & Lunn, J. (2008). Mycoprotein and health. *Nutr Bull*, 33 (4), 298-310.
- Durfey, C. L., Swistek, S. E., Liao, S. F., Crenshaw, M. A., Clemente, H. J., Thirumalai, R. V., Steadman, C. S., Ryan, P. L., Willard, S. T. & Feugang, J. M. (2019). Nanotechnology-based approach for safer enrichment of semen with best spermatozoa. *J Anim Sci Biotechnol*, 10 (1), 1-12.
- Eenennaam, V. & Louise, A. (2017). Genetic modification of food animals. *Curr Opin Biotechnol*, 44, 27-34.
- Erkmen, O. (2010). Gıda kaynaklı tehlikeler ve güvenli gıda üretimi. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 53 (3), 2020-235.
- European Commission. (2016). Innovative functional foods based on sweet lupin protein for cardiovascular prevention. <https://cordis.europa>.

- [eu/project/id/285819/reporting](https://www.euro.oxfordjournals.org/doi/full/10.1093/euro/19.1.1).
- Florini, J. R., Magri, K. A., Ewton, D. Z., James, P. L., Grindstaff, K. & Rotwein, P. S. (1991). "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. *J Biol Chem*, 266 (24), 15917-15923.
- Fountain, H. (2013). Building a \$325,000 Burger. *The New York Times*. <https://www.nytimes.com/2013/05/14/science/engineering-the-325000-in-vitro-burger.html>.
- Frezal, C., Nenert, C. & Gay, H. (2022). Meat protein alternatives opportunities and challenges for food systems' transformation. *OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers*, 182, 1-53.
- Gross, R. (2014). How will religious authorities deal with lab-grown meat? <https://geneticliteracyproject.org/2014/09/17/how-will-religious-authorities-deal-with-lab-grown-meat/>.
- Hocquette, A., Lambert, C., Sinquin, C., Peterloff, L., Wagner, Z., Bonny, S. P. F., Lebert, A. & Hocquette, J. F. (2015). Educated consumers don't believe artificial meat is the solution to the problems with the meat industry. *J Integr Agric*, 14 (2), 273-284.
- Hoek, A. C., van Boekel, M. A., Voordouw, J. & Luning, P. A. (2011). Identification of new food alternatives: How do consumers categorize meat and meat substitutes?. *Food Qual Prefer*, 22 (4), 371-383.
- Hopkins, P. D. & Dacey, A. (2008). Vegetarian meat: Could technology save animals and satisfy meat eaters?. *J Agric Environ Ethics*, 21 (6), 579-596.
- Javaid, M. & Haleem, A. (2019). 4D printing applications in medical field: a brief review. *Clin Epidemiology Glob Health*, 7 (3), 317-321.
- Johnson, D., Wang, S. & Suzuki, A. (2000). Edamame: A vegetable soybean for Colorado. *Energy (Kcal)*, 582, 573.
- Joshi, V. K. & Kumar, S. (2015). Meat analogues: Plant based alternatives to meat products-a review. *Int J Food Ferment Technol*, 5 (2), 107-119.
- Ko, H. J., Wen, Y., Choi, J. H., Park, B. R., Kim, H. W. & Park, H. J. (2021). Meat analog production through artificial muscle fiber insertion using coaxial nozzle-assisted three-dimensional food printing. *Food Hydrocoll*, 120, 106898.
- Krintiras, G. A., Diaz, J. G., Van Der Goot, A. J., Stankiewicz, A. I. & Stefanidis, G. D. (2016). On the use of the Couette Cell technology for large scale production of textured soy-based meat replacers. *J Food Eng*, 169, 205-213.
- Kumar, P., Chatli, M. K., Mehta, N., Singh, P., Malav, O. P. & Verma, A. K. (2016). Meat analogues: Health promising sustainable meat substitutes. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 57 (5), 923-932.
- Li, B. J., Li, P. H., Huang, R. H., Sun, W. X., Wang, H., Li, Q. F., Chen, J., Wu, W. J. & Liu, H. L. (2015). Isolation, culture and identification of porcine skeletal muscle satellite cells. *Asian-Australas J Anim Sci*, 28 (8), 1171.
- Mannello, F. & Tonti, G. A. (2007). Concise review: No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: Conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold!. *Stem cells*, 25 (7), 1603-1609.
- Martin, I., Wendt, D. & Heberer, M. (2004). The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends Biotechnol*, 22 (2), 80-86.
- Mateti, T., Laha, A. & Shenoy, P. (2022). Artificial Meat Industry: Production, methodology, challenges, and future. *JOM*, 74 (9), 3428-3444.
- Mattice, K. D. & Marangoni, A. G. (2020). Comparing methods to produce fibrous material from zein. *Food Res Int*, 128, 108804.
- Mc Clements, D. J. (2020). Future foods: How modern science is transforming the way we eat. *Food & Function* 11 (3), 1933-1945.
- Muslu, M. (2021). Yapay Et (Sentetik Et-Kültür Eti), küresel protein gereksinimi için alternatif bir kaynak olabilir mi? 4th International Health Sciences and Life Congress Full Text Book-1, Burdur, Turkey, 2021, 339-348.
- Nout, M. R. & Kiers, J. L. (2005). Tempe fermentation, innovation and functionality: update into the third millenium. *J Appl Microbiol*, 98 (4), 789-805.
- OECD/FAO (2022). *OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031*. OECD Publishing, Paris, 2022,



- 1-363.
- Oikonomopoulos, A., van Deen, W. K., Manansala, A. R., Lacey, P. N., Tomakili, T. A., Ziman, A. & Hommes, D. W. (2015). Optimization of human mesenchymal stem cell manufacturing: the effects of animal/xeno-free media. *Sci Rep*, 5, 16570.
- Orzechowski, A. (2015). Artificial meat? Feasible approach based on the experience from cell culture studies. *J Integr Agric*, 14 (2), 217-221.
- Pandurangan, M. & Kim, D.H. (2015). A novel approach for in vitro meat production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 99 (13), 5391-5395.
- Petetin, L. (2012). The revival of modern agricultural biotechnology by the UK Government: what role for animal cloning? *Eur Food Feed Law Rev*, 7 (6), 296-311.
- Poinski, M (2021). Aleph farms and the technion reveal world's first cultivated ribeye steak. <https://www.fooddive.com/news/aleph-farms-unveils-worlds-first-cell-based-ribeye-steak/594830/>.
- Polat, H. & Yılmaz Tuncel, N. (2020). Sürdürülebilir Et Üretimi. *Gıda*, 46 (1), 134-151.
- Post, M. J. (2012). Cultured meat from stem cells: Challenges and prospects. *Meat Sci*, 92 (3), 297-301.
- Riaz, M. N. (1999). Healthy baking with soy ingredients. *Cereal Foods World*, 44, 136-139.
- Saygın-Alparslan, Ö. & Demirbaş, N. (2019). Sağlık meslek mensuplarının kırmızı et ve işlenmiş kırmızı et tüketim tercihleri. *J Anim Prod*, 60 (2), 105-110.
- Schmidinger, K. (2012). Worldwide alternatives to animal derived foods—overview and evaluation models. Solution to global problems caused by livestock. Vienna, Austria, Thesis of PhD, University of Natural Resources and Life Sciences, Diss.
- Schneider, Z. (2013). In vitro meat: space travel, cannibalism, and federal regulation. *Houst Law Rev*, 5, 991.
- Schnitzler, A. C., Verma, A., Kehoe, D. E., Jing, D., Murrell, J. R., Der, K. A., Aysola, M., Rapiejko, P. J., Punreddy, S. & Rook, M. S. (2016). Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: current technologies and challenges. *Biochem Eng J*, 108, 3-13.
- Schreuders, F.K., Dekkers, B. L., Bodnár, I., Erni, P., Boom, R. M. & van der Goot, A. J. (2019). Comparing structuring potential of pea and soy protein with gluten for meat analogue preparation. *J Food Eng*, 261, 32-39.
- Seah, J. S. H., Singh, S., Tan, L. P. & Choudhury, D. (2022). Scaffolds for the manufacture of cultured meat. *Crit Rev Biotechnol*, 42 (2), 311-323.
- Shanmugasundaram, S. (1991). Vegetable Soybean: research needs for production and quality improvement: proceedings of a workshop held at Kenting, Taiwan, 1991, 91-346.
- Siegrist, M., Sütterlin, B. & Hartmann, C. (2018). Perceived naturalness and evoked disgust influence acceptance of cultured meat. *Meat Sci*, 139, 213-219.
- Sikka, T. (2020). The “embodied multi-material layering” of in vitro meat. *Techné: Research in Philosophy and Technology*, 24 (1-2), 158-177.
- Skardal, A., Zhang, J. & Prestwich, G. D. (2010). Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials*, 31 (24), 6173-6181.
- Snyman, C., Goetsch, K. P., Myburgh, K. H. & Niesler, C. U. (2013). Simple silicone chamber system for in vitro three-dimensional skeletal muscle tissue formation. *Front Physiol*, 4, 349.
- Stanojevic, S., Barac, M., Pesic, M., Milovanovic, M. M. & Vucelic-Radovic, B. (2010). Protein composition in tofu of corrected quality. *Acta Period Technol*, (41), 77-86.
- Stephens, N., Di Silvio, L., Dunsford, I., Ellis, M., Glencross, A. & Sexton, A. (2018). Bringing cultured meat to market: Technical, socio-political, and regulatory challenges in cellular agriculture *Trends Food Sci Technol*, 78, 155-166.
- Uzundumlu, A. S., Işık, H. B. & Kırılı, M. H. (2011). İstanbul İli Küçük Çekmece İlçesinde En Uygun Et Tipinin Belirlenmesi. *Alnteri Zirai Bilimler Dergisi*, 21 (2), 40-48.
- Verbeke, W., Marcu, A., Rutsaert, P., Gaspar, R., Seibt, B., Fletcher, D. & Barnett, J. (2015). ‘Would you eat cultured meat?’: Consumers’ reactions and



- attitude formation in Belgium, Portugal and the United Kingdom. *Meat Sci*, 102, 49-58.
- Verzijden, K. & Lawyers, A. (2012). EFSA Update on Cloning in Relation to Food Production. <http://static.basenet.nl/cms/106131/website/Publicaties-2012/120716%20EFSA%20Statement%20on%20use%20of%20clones%20for%20food%20production.pdf>.
- Wang, H. J. & Murphy, P. A. (1994). Isoflavone content in commercial soybean foods. *J Agric Food Chem*, 42 (8), 1666-1673.
- Wang, Y., Xiao, X. & Wang, L. (2020). In vitro characterization of goat skeletal muscle satellite cells. *Anim Biotechnol*, 31 (2), 115-121.
- WHO. (2020). Zoonoses. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>.
- Wild, F., Czerny, M., Janssen, A. M., Kole, A. P., Zunabovic, M. & Domig, K. J. (2014). The evolution of a plant-based alternative to meat. *Agro Food Industry Hi Tech*, 25 (1), 45-49.
- Yetim, H. & Tekiner, İ. H. (2020). Alternatif protein kaynaklarından yapay et üretimi kavramına eleştirel bir bakış. *Helal ve Etik Araştırmaları Dergisi*, 2 (2), 85-100.
- Yıbar, A. & Çetin, E. (2014). Hayvan refahının et kalitesi üzerine etkileri. *Uludağ Üniv Vet Fak Derg*, 32 (2), 31-37.
- Zhang, G., Zhao, X., Li, X., Du, G., Zhou, J. & Chen, J. (2020). Challenges and possibilities for bio-manufacturing cultured meat. *Trends Food Sci Technol*, 97, 443-450.
- Zhang, L., Hu, Y., Badar, I. H., Xia, X., Kong, B. & Chen, Q. (2021). Prospects of artificial meat: Opportunities and challenges around consumer acceptance. *Trends Food Sci Technol*, 116, 434-444.
- Zhang, J., Shi, H. & Sheng, J. (2022). The effects of message framing on novel food introduction: Evidence from the artificial meat products in China. *Food Policy*, 112, 102361.



## Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

### Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Merve GÖKLER<sup>a</sup>  
Oğuzhan KAHRAMAN<sup>b</sup>  
Zekeriya Safa İNANÇ<sup>c</sup>

Selçuk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,  
Hayvan Besleme ve Beslenme  
Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya

ORCID<sup>a</sup>: 0009-0008-5075-9150

ORCID<sup>b</sup>: 0000-0002-9315-5276

ORCID<sup>c</sup>: 0000-0003-0832-9209

\*Sorumlu Yazar: Oğuzhan KAHRAMAN

E-Posta: vetoguzhan90@gmail.com

Geliş Tarihi: 23.03.2023

Kabul Tarihi: 19.04.2023

14 (1): 16-24, 2023

DOI: 10.38137/vftd.1270038

## YUCCA SCHIDIGERA'NIN KÖPEK DİYETLERİNDE FONKSİYONEL KATKI MADDESİ OLARAK KULLANIMI VE ETKİLERİ

**ÖZET.** Evcil hayvanların sağlığını optimize etmek için kullanılan fonksiyonel katkıların rolü önem kazandıkça fonksiyonel gıda ve katkıları köpek sahipleri arasında popülerlik kazanmaktadır. Biyoaktif fonksiyonel özellikleri nedeniyle sık kullanılan bitkilerden biri de *Yucca schidigera*'dir. *Yucca* ekstraktı insan, at, çiftlik hayvanları ve kedi-köpek diyetlerinde uzun süredir yem katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. *Yucca* tozunun veya ekstraktının ana bileşenleri antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antiprotozoal, antimutajenik, antikanser ve kolesterol azaltımına sahip steroidal saponinler, polisakkaritler ve polifenollerdir. *Yucca* sağlık ve performansla olumlu etkileri, besin madde yararlanımı artırma, dışkı kokusunu azaltma, amonyak ve hidrojen sülfid gibi bazı zararlı uçucu bileşiklerin giderilmesi amacıyla köpeklerde yem katkı maddesi olarak değerlendirilir. Yaygın kullanılan bir katkı maddesi olmasına rağmen *Yucca*'nın köpeklerdeki etkileri hakkında çok az çalışma yapılmıştır. Ayrıca, dışkı kokusunu azaltıcı etkileri dışında köpekler üzerindeki etkileri bilinmemektedir. Bu derlemede *Yucca schidigera*'nın köpeklerde sağlık, sindirilebilirlik, dışkı kokusu, bağırsak gazı oluşumu, kan parametreleri, oksidasyon ve dışkı mikrobiyotasına olan etkilerinin tartışılarak açıklanması hedeflenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Dışkı kokusu, Fonksiyonel gıda, Katkı maddesi, Köpek, *Yucca schidigera*.

## EFFECTS OF YUCCA SCHIDIGERA AS A FUNCTIONAL FEED ADDITIVE IN DOG DIETS

**ABSTRACT.** Functional foods and additives are gaining popularity among dog owners as the role of functional additives in optimizing pet health becomes important. *Yucca schidigera* is one of the frequently used plants due to its bioactive functional properties. *Yucca* extract has long been using as a feed additive in human, horse, livestock and cat-dog diets. The main components of *yucca* powder or extract are steroidal saponins, polysaccharides and polyphenols, which have antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, antiprotozoal, antimutagenic, anticancer and cholesterol lowering effects. *Yucca* is considered as a dietary additive in dogs for its positive effects on health and performance, increasing nutrient availability, reducing fecal odor and removing some harmful volatile compounds such as ammonia and hydrogen sulfide. Despite being a widely used additive, few studies have been conducted on the effects of *Yucca* in dogs. Moreover, it's other effects on dogs are unknown, apart from fecal odor-reducing effects. In this review, it is aimed to discuss and explain the effects of *Yucca schidigera* on health, digestibility, fecal odor, intestinal gas formation, blood parameters, oxidation and fecal microbiota in dogs.

**Keywords:** Feed additive, Dog, Fecal odor, Functional food, *Yucca schidigera*.

### Makale atfı

Gökler, M. ve ark. (2023). *Yucca Schidigera*'nın Köpek Diyetlerinde Fonksiyonel Katkı Maddesi Olarak Kullanımı Ve Etkileri, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (1), 16-24. DOI: 10.38137/vftd.1270038

## GİRİŞ

Katkı maddeleri, besinsel faydalar ve gıda güvenliğini sağlamak, istenen renk, tat, doku, stabilite ve bozulmaya karşı direnç özelliklerini korumak için işlenmiş evcil hayvan diyetlerine dahil edilir (Craig, 2021). Antibiyotikler yerine büyüme destekleyicileri, immünstimülanlar ve antioksidatif ajanlar olarak etkili olan doğal alternatif maddelerin kullanılması her geçen yıl artış göstermektedir. Fitomedikaller olarak bilinen doğal bitki ekstraktlarının hem çeşitli hastalıkların tedavisinde yardımcı olmaları hem de sağlığa yararlarından dolayı kullanımı söz konusudur. Bitkisel ekstraktları düşük toksisite ve kalıntı özelliklerinden dolayı tercih edilmektedir. Şifalı otlar ve bunların özleri, hayvan besleme alanında başarıyla uygulanmaktadır (Paray ve ark., 2021).

Dışkı kıvamı, hacmi, rengi ve kokusu gibi belirtiler evcil hayvan sahiplerinin fark edebileceği gastrointestinal sağlık belirtileri olduğu için özellikle koku azaltıcı maddeler köpek mamalarında sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Biyoaktif özellikleri nedeniyle sık kullanılan bitkilerden biri de *Yucca schidigera*'dır. *Yucca* ekstraktı insan, at, çiftlik hayvanları ve kedi-köpek diyetlerinde uzun süredir yem katkı maddesi olarak güvenle kullanılmaktadır (Sen ve ark., 1998). *Yucca* tozunun veya ekstraktının ana bileşenleri, antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antiprotozoal, antimutajenik, antikanser ve kolesterol azaltımına sahip steroidal saponinler, polisakaritler ve polifenollerdir. *Yucca* bol miktarda saponin ve resveratrol içerir, bu da kalın bağırsak fermentasyonu ve protein parçalanması sonucu oluşan amonyağı ortadan kaldırarak hayvan performansı ve sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini azaltır (Eryavuz ve Dehority, 2004; Sahoo ve ark., 2015).

*Yucca schidigera* köpeklerde sıkça kullanılan bir katkı maddesi olmasına rağmen etkileri hakkında çok az çalışma yapılmıştır. Dışkı kokusunu azaltıcı etkileri dışında köpekler üzerindeki diğer etkileri bilinmemektedir. Bundan dolayı bu derlemede *Yucca schidigera*'nın köpeklerde sindirilebilirlik, dışkı kokusu, bağırsak gazı oluşumu, kan parametreleri, antioksidatif, antienflamatuar, antiartritik ve dışkı mikrobiyotasına olan etkileri açıklanmıştır.

## *Yucca Schidigera*'nın Dışkı Kokusu Üzerine Etkisi

Köpek yemlerinde dışkı kokusunu azaltıcı ve artıcı etkisi olan en önemli bileşik proteindir. Köpeklerin enerji ve protein dengelerine göre formüle edilen yüksek proteinli ve düşük karbonhidratlı ticari mamalar mevcuttur (Beynen, 2020). Diyet formüle edilirken köpekler için gerekli amino asitler en az veya en uygun düzeyde içecek şekilde ayarlanır (Hesta ve ark., 2003). Köpeklerde diyet proteininin ve metabolitlerinin büyük bir kısmı idrar ve dışkıyla atılır. Kalın bağırsağa ulaşan sindirilmemiş endojen ve eksojen protein burada bakteriyel fermentasyona uğrar (Fritsch ve ark., 2022). Deaminasyon ile amonyak, biojenik aminler, fenol gibi dışkıda keskin ve kötü koku oluşumuna neden olan pütrifaktif (çürütücü) bileşikler ortaya çıkar ve bu bileşiklerin artışı özellikle kalın bağırsak sağlığının bozulduğuna yönelik bir işarettir (Hesta ve ark., 2003). Dışkıda kötü koku, fazla protein tükeminin yanında düşük protein sindirilebilirliğine sahip diyetlerle de ortaya çıkar. Yüksek protein sindirimi ile kalın bağırsağa gelen az miktardaki protein dışkı kokusunun azaltılmasında etkilidir (Nery ve ark., 2010). Düşük protein sindirimine proteinin miktarı ve kalitesi yanında bazı katkılar da neden olabilir. Örneğin, köpek yemlerine fermente olabilen karbonhidratların eklenmesiyle, rumende mikrobiyal kütle artışına benzer şekilde köpeğin kalın bağırsağında mikrobiyal kütle üretilir (Calabrò ve ark., 2013). Bu durum diyet proteininin düşük oranda sindirildiği konusunda yanıltıcı olabilir. Çünkü diyet proteininin daha düşük sindirilmesinden ziyade dışkıyla daha çok bakteriyel protein atılımı gerçekleşebilir (Silvio ve ark., 2000).

Diyete *Yucca schidigera* ekstraktının dahil edilmesiyle köpek dışkısının kötü kokusunu iyileştirme potansiyeli duyuşal testlerle gösterilmiştir (McFarlane ve Metheney, 1988a; McFarlane ve Metheney, 1988b). *Yucca* dışkı kokusundaki azaltıcı etkilerini kalın bağırsaktaki metabolik ürünleri (indol, skatol) azaltarak, mikrofloraya etki ederek, üreazı inhibe ederek ve amonyağı bağlayarak gösterir (Matusiak ve ark., 2016). Yapılan bir çalışmada %27 ham protein içeren yemle beslenen köpeklere 15 gün boyunca 250 mg/kg canlı ağırlık *yucca* ekstraktı ilavesinin dışkı kokusunu azalttığı ve bu azaltıcı etkinin 24 günde en üst seviyeye çıktığı

belirlenmiştir (Lowe ve Kershaw, 1997). Araştırmacılar donmuş dışkıları erittikten sonra üç farklı kişiye koklatarak koku testini gerçekleştirmiş ve 1-5 skalası ile kokuları puanlamışlardır. Değerlendirmeyi 1: az kokulu, 5: çok kötü kokulu olarak yapmışlardır (Lowe ve Kershaw, 1997). Yüksek protein içeren diyetlerle beslenen köpeklerde yuccanın katkı maddesi olarak daha etkili olduğunu gösteren bir çalışmada Dos Reis ve ark. (2016) %25 ve %34 ham protein içeren diyetlerle beslenen köpeklere 0, 250, 500 ve 750 mg/kg yucca ekstratı ilave etmişler ve sonuç olarak, %34 ham proteinli mamayı tüketen ve 500 mg/kg yucca ilave edilen grupta dışkı kokusunun azaldığı belirlenmiş ve yem protein düzeyinden bağımsız olarak 750 mg/kg yucca ilavesinin dışkı amonyak düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir. Yucca ekstraktının farklı seviyelerde ilavesi ile dışkının kötü kokmasından sorumlu diğer bir bileşik olan amonyağın da azaldığı gözlenmiştir (Dos Reis ve ark., 2016). *Yucca schidigera*, ürenin ortamdaki amonyağa parçalanmasıyla ilgili bakteriyel bir enzim olan üreazın inhibisyonu üzerinde etki ederek amonyak düzeyini düşürür (Cheeke, 1999). Yuccanın dışkı amonyak düzeyini düşürücü etkisi olduğu belirtilse de köpek dışkı inokulumu ile yapılan bir *in vitro* çalışmada yucca amonyak konsantrasyonunu düşürmemiştir (Pinna ve ark., 2017). Benzer şekilde sekal materyalin amonyak içeriği, sarsaponin (*Y. schidigera*'dan ekstrakte edilen steroidal glikozitler) verilen ratlarda da azalmamıştır (Preston ve ark., 1987). Kullanılan bazı yucca dozları dışkı amonyak düzeyini azaltsa da koku üzerine etkisiz kalabilir. Bu durumda dışkıda koku oluşumundan sadece amonyak değil aynı zamanda fenolik bileşikler ve uçucu yağ asitlerinin de sorumlu olduğu düşünülebilir (Moore ve ark., 1987).

#### ***Yucca schidigera*'nın Sindirilebilirlik Üzerine Etkisi**

Yuccanın köpeklerde diyet sindirilebilirliğine etkisi ile ilgili yapılan çalışmalarda Santos ve ark. (2016) köpek yemine ilave ettikleri yuccanın kuru madde, organik madde ve ham protein sindirilebilirliğine bir etkisinin olmadığını belirlemiştir. Benzer şekilde, Dos Reis ve ark. (2016) yucca ilave ettikleri köpek mamalarında sindirilebilirlik bakımından kontrol grubuyla benzer olduğunu rapor etmiştir. Maia ve ark.'da (2010) köpek mamasına 0, 125, 250 ve 375 mg/kg yucca ekstratı ilavesi yaptıkları çalışmalarında besin maddesi

sindirilebilirliği bakımından gruplar arasında önemli bir farklılık bulmamıştır. Bu çalışmaların ışığında yucca ve ekstraktının köpek diyetlerinde sindirilebilirliğe bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

#### ***Yucca schidigera*'nın Şişkinlik ve Gaz Oluşumu Üzerine Etkisi**

Gaz veya şişkinlik, insanlarda günlük olarak sık görülen bir durumdur ve genellikle rahatsızlık vermez veya çok hafif bir rahatsızlık verir. Bazı insanlar aşırı gaz üretimi veya şiddetli ağrı ile ilişkili olan ve genellikle diyet değişiklikleri ile rahatlayan gastrointestinal distansiyona karşı tıbbi destek alırlar (Tomlin ve ark., 1991). Fakat, köpeklerde rektal gazların kökenleri ve doğası, bunların fizyolojik ve klinik önemi veya köpeklerde şişkinliği azalttığı iddia edilen çeşitli ilaçların etkinliği hakkında çok az araştırma yapılmıştır. Yucca ekstraktının köpeklerde şişkinlik üzerindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada, yucca ekstraktı katkı maddesinin toplam gaz üretimini, gaz ataklarının sayısını ve sıklığını etkilemediği ancak, hidrojen sülfid üretimini %38 oranında azalttığı belirlenmiştir (Giffard ve ark., 2001). Fakat, Dos Reis ve ark.'nın (2016) köpekler üzerinde yürüttüğü çalışmada mamalara 250 ve 500 mg/kg yucca ilavesiyle bağırsak gazı azalmıştır. Köpeklerde bağırsak gazı üretimi kalın bağırsak fermentasyonu ile ilgilidir. Yemin karbonhidrat ve lif içeriği kalın bağırsak fermentasyonuna etki ederek köpeklerde mikrobiyota ve gaz üretimini değiştirebilir (Biagi ve ark., 2010). Sindirilebilirliği düşük diyetler de kalın bağırsakta fermentasyona maruz kalarak gaz üretimini artırabilir (Inal ve ark., 2017). Köpeklerde kalın bağırsak fermentasyonu ile açığa çıkan karbondioksit, hidrojen, metan ve uçucu özellikteki kükürtlü bileşikler dışında aerofaji yani hava yutma sonucu da oluşabilir (Roudebush, 2001). Yucca ürünlerinin tek başına köpeklerde gaz veya gaz kokularını etkili bir şekilde kontrol altına alıp almadıkları bilinmemektedir (Roudebush, 2001). Yucca ekstraktının, aktif kömür ve çinko asetat ile kullanıldığında köpeklerde yüksek derecede kokulu gaz ataklarını azalttığı belirtilmiştir (Giffard ve ark., 2001). Yuccanın gaz üretimine etkilerinden ziyade bunun asıl sebebi olan beslenme düzeni değerlendirilerek farklı formülasyonlarla hazırlanmış diyetler köpeklerde gaz oluşumunu azaltmak için kullanılmalıdır.

### ***Yucca Schidigera*'nın Mikrobiyotaya Etkileri**

Köpek gastrointestinal sisteminde, konağın beslenme ve sağlık durumunun korunmasında temel rol oynayan çok çeşitli karmaşık mikrobiyal topluluklar yaşar. Yem bileşimi, bağırsak mikrobiyotası ve metabolizmasını yönlendiren ana faktörlerden biri olarak kabul edilmektedir (Russell ve ark., 2013). *Y. schidigera*'nın antimikrobiyal, antiprotozoal ve antifungal aktiviteleri olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2000; McAllister ve ark., 2001). *Y. schidigera*'nın biyolojik etkileri, yüksek steroidal saponin içeriğine bağlanmıştır (Patra ve Saxena, 2009); ancak, Duffy ve ark. (2001), gözlemlenen etkilerin saponin olmayan fraksiyondan (butanol olmayan fraksiyon) da kaynaklandığını bildirmiştir. Köpek dışkı inokulumu kullanılarak yapılan bir *in vitro* çalışmada yucca ekstraktının isobütirik asit ve biyojenik aminlerden cadaverine seviyesini önemli düzeyde düşürdüğü spermin düzeyini ise artırdığı belirlenmiştir (Pinna ve ark., 2021). İsobütirik asit bakteriyel protein katabolizmasının bir göstergesidir. Biyojenik aminler ise canlı hücrelerde önemli metabolik aktiviteye sahip moleküllerdir. Bağırsak florası bakterileri de amino asitleri dekarboksile ederek biyojenik aminleri oluşturur (Ku ve ark., 2013).

Yucca ekstraktı ilavesi dışkıda yararlı bakterilerden olan *Enterococcus spp.* bakterilerinde artış sağlamıştır. Yucca tek başına zararlı bakterilerden *Escherichia coli* (*E.coli*) miktarına etki etmemekle birlikte kondanse tanenle kombine kullanılması *E.coli* düşüşü sağlamıştır (Pinna ve ark., 2021). Literatürde *Y. schidigera*'nın bir prebiyotik görevi görebileceğini gösteren hiçbir kanıt yoktur, bu nedenle enterokok artışının Yucca ekstraktının enterokok üzerindeki doğrudan etkisinin mi yoksa içeriğinde bulunan saponinler tarafından enterokok antagonistlerinin inhibisyonunun sonucu mu olduğu bilinmemektedir (Pinna ve ark., 2021). Bir başka çalışmada Yucca saponinlerinin *E. coli* üzerinde antibakteriyel etkiler gösterebileceği gözlemlenmiştir (Sen ve ark., 1998). Fakat, Killeen ve ark. (1998), *Y. Schidigera*'nın saf *E. Coli* kültürleri üzerinde herhangi bir bakteriyostatik etkisi olmadığını bildirmiştir. Bununla birlikte, Wang ve ark. (2000), *Y. schidigera* da dahil olmak üzere farklı kaynaklardan elde edilen saponinlerin, Gram-pozitif bakterilere karşı Gram-negatif bakteriler (örn. *E. coli*) üzerinde daha etkili olduğunu

göstermiştir. Zúñiga-Serrano ve ark.'da (2022) tek midelilerde yucca ekstraktının belirli koşullar altında mikroorganizmalar üzerinde bir etkisinin olmadığını ve mikroorganizmaların büyümesinin substrata ve mevcut mikrobiyota çeşitliliği ve sayısına bağlı olduğunu bildirilmiştir. Köpeklerde bu konu ile ilgili başka bir çalışma bulunmamaktadır. Yucca kanatlılarda patojen mikroorganizmaların sayısını azaltma potansiyeline sahiptir. Fakat, laktik asit üreten yararlı bakterilerin büyümesini etkileyebilir. Bununla ilgili olarak Ayoub ve ark. (2019) etlik piliçlerin içme suyuna yucca ekstraktı ilavesi ile toplam bakteri sayısı ve *E. Coli* de azalma gözlemlenmiş ancak, laktik asit üreten bakteri sayılarının etkilenmediğini bildirmişler. Matusiak ve ark. (2016) topladıkları kanatlı dışkısına %5 yucca ekstraktı ilavesinin *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium* dahil olmak üzere birçok patojenik mikroorganizma popülasyonunu azalttığını gözlemlenmiştir. Ayrıca, %15 yucca ilavesi, potansiyel olarak patojenik tüm mikroorganizmaları azaltmıştır. Faydalı laktik asit bakterilerinden *Leuconostoc mesenteroides* ve *Lactiplantibacillus plantarum* ise yucca ilavesinden etkilenmemiştir. Diğer bir kanatlı çalışmada Kaprilik asit ve *Yucca schidigera* ekstraktının karışım ilavesi dışkıda *E. Coli* bakterisini azaltmış ancak, yumurtacı tavuk veya etlik piliçlerde *Lactobacillus* üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (Begum ve ark., 2015). Katkı maddeleri dışında köpeklerde bağırsak mikrobiyotasına etki eden diğer önemli besin maddesi proteindir. Yüksek protein içeren yaş mamalarla beslenen köpeklerde kuru mamalara göre bağırsak *Lactobacillus* ve *Bifidobacteria* azalırken *Clostridia* bakterileri artış göstermiştir (Martineau ve Laflamme, 2002). Köpekler yüksek protein düzeylerinde beslendiklerinde kalın bağırsakta protein fermentasyonuna bağlı ortaya çıkabilecek zararlı ürünler ve buna bağlı olarak zararlı bakterilerin artışını önlemek için diyetlerine yucca ilavesi düşünülebilir.

### ***Yucca schidigera*'nın Antioksidatif, Antiinflamatuvar ve Antiartritik Etkileri**

Yucca fizyolojik olarak aktif birkaç fitokimyasal içerir. Yucca'nın anti-artritik etkilerine ilişkin tek doğrudan çalışma, artritisi olan insanlarda ağrı ve şişlik semptomlarının yucca tüketilmesiyle rahatladığını bildiren Bingham ve ark.'nın (1976) çalışmalarıdır.



Bu araştırmacıların raporları sadece insanlarda değil, aynı zamanda atlarda ve köpeklerde de artrit tedavisi ve önlenmesi için yucca ürünlerinin yaygın şekilde kullanılmasına yol açmıştır (Cheeke ve ark., 2006). Yucca ayrıca resveratrol ve bir dizi başka stilben (yuccaol A, B, C, D ve E) dahil olmak üzere zengin bir polifenolik kaynağıdır. Bu fenolikler anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir (Piacente ve ark., 2005). Yucca ürünleri, nutrasötik endüstrisi tarafından anti-artrit olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Tablet formundaki yucca bitkisi tozu yaygın bir nutrasötik, yani sağlığa faydalı biyoaktif bileşenler içeren ürünlerdir. Yapılan araştırmalar yuccanın anti-inflamatuar aktivite ile artrit önlemede etkili olduğunu ileri sürmüştür (Oleszek ve ark., 2001). Marzocco ve ark. (2004) yuccaollerin indüklenebilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Nitrik oksit bir enflamatuar ajandır ve dokularda inflammatuar yanıtlar sırasında artar. Nitrik oksit sentaz da bir transkripsiyon faktörü olan NF kappa B (NFkB) tarafından kontrol edilir. Resveratrol ve yucca fenolikleri NFkB'yi güçlü bir şekilde inhibe eder (Marzocco ve ark., 2004). Özellikle Yuccaol C etkilidir. Bu nedenle, yucca tozu, NFkB aktivasyonunun inhibisyonu yoluyla güçlü anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir. Reaktif oksijen türlerinin (serbest radikaller) oluşumu, insan ve hayvan modellerinde romatoid artrit gelişmesinde ve sürdürülmesinde önemli bir faktördür. Serbest radikallerin bir diğer kaynağı, sinoviyositler ve kondrositler içinde üretilen ve oldukça toksik radikal peroksinitrite yol açan nitrik oksittir (Darlington ve Stone, 2001). Hayvanlarda yapılan deneysel artrit çalışması, iNOS aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir (Sakurai ve ark., 1995). Yucca polifenolikleri iNOS indüksiyonunu inhibe ederek reaktif oksijen türlerinin (ROS) artrit tetiklemesini önleyebilir.

Serbest radikaller metabolizmadaki kimyasal süreçlerin doğal yan ürünleridir. Oksidatif stres, serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller lehine bozulmasıdır. Antioksidanlar oksidatif zincir reaksiyonlarının başlamasını ve devam etmesini engelleyen ya da geciktiren bileşiklerdir (Dündar ve Aslan, 2006). Serbest radikaller lipidler, proteinler ve nükleik asitlerle etkileşerek membran bütünlüğünün kaybına, proteinlerde yapısal veya

fonksiyonel değişikliklere ve genetik mutasyonlara yol açmaktadır. Organizma bu zararlı radikallerin etkisiyle başa çıkabilmek için bazı enzimatik ve non enzimatik antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Yucca katkısının köpeklerin antioksidan durumuna etkileri hakkında çalışmalar yapılmamıştır. Yuccanın kanatlılarda kullanıldığı çalışmalarda Ayoub ve ark. (2019) etlik piliçlerin içme sularına yucca ekstraktı takviyesi yaparak antioksidan enzimlerde (süperoksitdismutaz, katalaz, glutasyonperoksidaz) artış, lipid peroksidasyonu (Malondialdehit) düzeylerinde ise azalma gözlemlemiştir.

Yucca bitki kökü fosfor, sodyum, selenyum, demir, çinko, kalsiyum, manganez, bakır, demir, potasyum ve A, C ve B vitamin kompleksi içerir ve insanlarda çeşitli iltihaplı rahatsızlıklarda kullanılır (Patel, 2018). Köpeklerde yucca kökünün kullanıldığı ve çeşitli rahatsızlıklarda semptomları azaltıcı etkisinin olup olmadığı belinmemektedir.

### ***Yucca schidigera*'nın Kan Parametreleri Üzerine Etkisi**

Saponinlerin kolesterol ile çözünmeyen kompleksler oluşturduğu uzun yıllardır bilinmektedir. Saponinler, kolesterol ve safra asitleri gibi sterollerle miseller oluşturur. Saponinlerin kolesterol ve diğer sterollerle olan etkileşimleri özellikle zar aktivitesi ile ilgili olanlardan sorumludur. Saponinin rat ve yumurta tavuklarında kan kolesterol seviyelerini düşürdüğü belirlenmiştir (Southon ve ark., 1988; Aslan ve ark., 2005). Bu kolesterol düşürücü etki, saponinlerin safra ile atılan kolesterole bağlanmasının bir sonucudur, böylece entero-hepatik kolesterol geri dönüşümü inhibe edilir. Diyetle alınan yucca, hiperkolesterolemik insanlarda toplam ve LDL kolesterol seviyelerini düşürmüştür (Kim ve ark., 2003). Saponinler, mukozal hücre zarlarında kolesterol ile kompleksler oluşturarak bağırsak hücrelerinin geçirgenliğini etkiler. Diğer hayvan türlerinde yapılan çalışmalarda diyetle alınan saflaştırılmış saponinlerin serum kolesterol konsantrasyonunu ratlarda doğrudan ince bağırsaklardan emilimini engelleyerek (Oakenfull ve ark., 1979) azaltsa da köpekler için bu durum söz konusu olmamıştır (Dos Reis ve ark., 2016). Köpeklerde diyetle 750 mg/kg yucca ekstraktı ilavesinin serum kolesterolüne etkisi gözlenmemiştir (Dos Reis ve ark.,

2016). Bunun yanında rasyonlarına 100, 150 ve 200 mg/kg takviye edilen yumurtacı tavuklarda kontrol grubuna kıyasla serum kolesterol seviyelerinde azalma bildirilmiştir (Aslan ve ark., 2005).

Köpeklerde diyetle yucca dahil edilmesi, serum üre konsantrasyonunda önemli değişikliklere neden olmamıştır (Dos Reis ve ark., 2016). *Yucca schidigera* saponinlerini tüketen fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, 120 mg/kg ilave edilen grupta üre düzeylerini düşmüştür (Preston ve ark., 1987). Tavşanlarda ise 250 mg/kg yucca ekstraktı eklenmesiyle üre seviyelerinde önemli bir değişiklik olmamıştır (Hussain ve ark., 1996). Kedilerde yucca takviyesi yapıldığı bir çalışmada 375 mg/kg dozuna kadar üre düzeylerinde önemli bir değişiklik olmamıştır (Roque ve ark., 2011). Bildiricilerle yapılan bir çalışmada ise 100 ve 200 mg/kg yucca tozu ilave edilen grupta serum kolesterol ve trigliserid düzeyinin düştüğü belirlenmiştir (Kaya ve ark., 2003). Köpeklerde yucca ilavesi yapılan birkaç çalışmada tutarsız sonuçlar vardır (Roque ve ark., 2011). Diğer hayvan türlerinde de bu tutarsız durum söz konusudur.

Dos Reis ve ark.'nın (2016) köpek diyetine 750 mg/kg yucca ekstraktı eklemesiyle hayvanlarda ALT enziminin aktivitesinde artış eğilimi gözlenmişse de referans limitin üzerinde olmamıştır. Hepatositlerdeki belirgin toksik hasar, muhtemelen ekstraktta bulunan toksik maddelerin etkisiyle ilişkilendirilebilir bu da ALT gibi enzimlerinin aktivitesinde artışa neden olur (Kaneko ve ark., 2008). Fakat çalışmalar genel olarak kısa süreli olduğu için yuccanın köpeklerde karaciğer üzerine toksik etkisi olup olmadığı hakkında daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Köpeklerde yucca ilavesinin (0, 250, 500, 750 mg/kg) hematolojik parametrelerden hemoglobin (HB), ortalama eritrosit hacmi (MCV), ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC), hematokrit ve eritrosit üzerine etkisi olmamıştır. Sadece eritrosit başına düşen ortalama hemoglobin miktarı yani MCH düzeyi 750 mg/kg verilen grupta artmıştır (Dos Reis ve ark., 2016). Yuccanın köpeklerin kan parametreleri üzerine etkisi hakkında bilimsel verilerin elde edilebilmesi için farklı hastalık durumundaki köpekler kullanılarak çalışmalar yürütülmelidir.

## SONUÇ

Son yıllarda köpeklerin sağlıklı beslenmesine yönelik çalışmalarla birlikte yem katkı maddeleri popüler hale gelmiştir. Köpek katkı maddeleri genellikle gıda güvenliği ve mamaların istenen renk, tat, doku, stabilite ve bozulmaya karşı direnç özelliklerini korumak için formülasyonlara dahil edilir. Mamaların raf ömrü ve kalitesine etkilerinin yanında hayvan sağlığına iyi gelen fonksiyonel katkı maddeleri de araştırılması gereken konulardan biridir. Yucca bitkisi köpeklerde dışkı kokusu ve gaz oluşumunu düşürücü etkilerinden dolayı formülasyonlara eklenmektedir. Yuccanın insan sağlığı üzerine etkileri hakkında yapılmış çalışmalar baz alınarak köpeklerde de faydalı olabileceği düşünülmüş ve kullanılmaya başlanmıştır. *Yucca schidigera*'nın köpeklerde etkileri ile ilgili dünyada yapılmış çok az çalışma vardır. Bu çalışmalara göre de sadece dışkı kokusunu azaltıcı etkisi bakımından köpeklerde faydalı olduğu görülmektedir. Bu etki de yuccanın ilave edildiği doz veya miktarı ile ilişkilidir. İnsanlar arasında popüler olan bir ürünün köpeklerde kullanımı hakkında daha doğru kararlar verebilmek için çok daha fazla çalışma yapılmalıdır. Köpek diyetleri oldukça değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda köpeklerde ırk ve fizyolojik durum katkı maddelerinin etkinliğini değiştirebilen faktörlerdir. Yuccanın etkinliği araştırılırken tüm bu faktörler dikkate alınarak kapsamlı denemeler yapılmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Aslan, R., Dundar, Y., Eryavuz, A., Bulbul, A., Kuçukkurt, I. & Fidan, A. F. (2005). Effects of various quantities of *Yucca schidigera* powder (Deodorase) added to diets on the performance, some hematological and biochemical blood parameters, and total antioxidant capacity of laying hens. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 156 (6), 350-555.
- Ayoub, M. M., Ahmed, H. A., Sadek, K. M., Alagawany, M., El-Hack, M. E. A., Othman, S. I., Allam, A. A. & Abdel-Latif, M. A. (2019). Effects of liquid yucca supplementation on nitrogen excretion, intestinal bacteria, biochemical and performance parameters in broilers. *Animals (Basel)*, 9 (12), 1097.

- Begum, M., Hossain, M. M. & Kim, I. H. (2015). Effects of caprylic acid and *Yucca schidigera* extract on growth performance, relative organ weight, breast meat quality, haematological characteristics and caecal microbial shedding in mixed sex Ross 308 broiler chickens. *Veterinari Medicina*, 60 (11).
- Beynen, A. C. (2020). Protein supply to adult dogs. *Bonny Canteen*, (1), 128.
- Biagi, G., Cipollini, I., Grandi, M. & Zaghini, G. (2010). Influence of some potential prebiotics and fibre-rich foodstuffs on composition and activity of canine intestinal microbiota. *Animal Feed Science and Technology*, 159 (1-2), 50-58.
- Bingham, R. (1976). New and effective approaches to the prevention and treatment of arthritis. *Journal of Applied Nutrition*, 28 (2), 38-47.
- Calabrò, S., Carciofi, A. C., Musco, N., Tudisco, R., Gomes, M. O. & Cutrignelli, M. I. (2013). Fermentation characteristics of several carbohydrate sources for dog diets using the in vitro gas production technique. *Italian Journal of Animal Science*, 12 (1), e4.
- Craig, J. M. (2021). Additives in pet food: are they safe? *Journal of Small Animal Practice*, 62 (8), 624-635.
- Cheeke, P. R. (2000). Actual and Potential Applications of *Yucca Schidigera* and *Quillaja Saponaria* Saponins in Human and Animal Nutrition. In *Saponins in Food, Feedstuffs and Medicinal Plants; Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Volume 45*; Oleszek, W., Marston, A., Editors. Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 241-254.
- Cheeke, P. R., Piacente, S. & Oleszek, W. (2006). Anti-inflammatory and anti-arthritic effects of *Yucca schidigera*: a review. *Journal of Inflammation*, 3 (1), 1-7.
- Darlington, L. G. & Stone, T. W. (2001). Antioxidants and fatty acids in the amelioration of rheumatoid arthritis and related disorders. *British Journal of Nutrition*, 85 (3), 251-269.
- Dos Reis, J. S., Zangerônimo, M. G., Ogoshi, R. C., França, J., Costa, A. C., Almeida, T. N. & Saad, F. M. (2016). Inclusion of *Yucca schidigera* extract in diets with different protein levels for dogs. *Animal Science Journal*, 87 (8), 1019-1027.
- Duffy, C. F., Killeen, G. F., Connolly, C. D. & Power, R. F. (2001). Effects of dietary supplementation with *Yucca schidigera* Roetzl ex Ortgies and its saponin and non-saponin fractions on rat metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (7), 3408-3413.
- Eryavuz, A. & Dehority, B. A. (2004). Effect of *Yucca schidigera* extract on the concentration of rumen microorganisms in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 117 (3-4), 215-222.
- Fritsch, D. A., Jackson, M. I., Wernimont, S. M., Feld, G. K., MacLeay, J. M., Brejda, J. J., ... & Gross, K. L. (2022). Microbiome function underpins the efficacy of a fiber-supplemented dietary intervention in dogs with chronic large bowel diarrhea. *BMC Veterinary Research*, 18 (1), 1-21.
- Giffard, C. J., Collins, S. B., Stoodley, N. C., Butterwick, R. F. & Batt, R. M. (2001). Administration of charcoal, *Yucca schidigera*, and zinc acetate to reduce malodorous flatulence in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218 (6), 892-896.
- Hesta, M., Janssens, G., Debraekeleer, J., Millet, S. & De Wilde, R. (2003). Fecal odor components in dogs: nondigestible oligosaccharides and resistant starch do not decrease fecal H<sub>2</sub>S emission. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 1 (3), 225-232.
- Hussain, I., Ismail, A. M. & Cheeke, P. R. (1996). Effects of feeding *Yucca schidigera* extract in diets varying in crude protein and urea contents on growth performance and cecum and blood urea and ammonia concentrations of rabbits. *Animal Feed Science and Technology*, 62 (2-4), 121-129.
- Inal, F., Alataş, M. S., Kahraman, O., İnal, Ş., Uludağ, M., Gürbüz, E. & Polat, E. S. (2017). Barley as an alternative to rice in dog food. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 41 (6), 770-774.
- Kaneko, J. J., Harvey, J. W. & Bruss, M. L. (2008). *Clinical biochemistry of domestic animals*. Academic press. 6rd edn, pp. 889-895.
- Kaya, S., Erdogan, Z. & Erdogan, S. (2003). Effect of different dietary levels of *Yucca schidigera* powder on the performance, blood parameters and egg yolk cholesterol of laying quails. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 50 (1), 14-17.

- Killeen, G. F., Madigan, C. A., Connolly, C. R., Walsh, G. A., Clark, C., Hynes, M. J. & Power, R. F. (1998). Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their in vitro properties for their in vivo impact. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (8), 3178-3186.
- Kim, S. W., Park, S. K., Kang, S. L., Kang, H. C., Oh, H. J., Bae, C. Y. & Bae, D. H. (2003). Hypocholesterolemic property of *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* extracts in human body. *Archives of Pharmacal Research*, 26, 1042-1046.
- Ku, B. S., Mamuad, L. L., Kim, S. H., Jeong, C. D., Soriano, A. P., Lee, H. I. & Lee, S. S. (2013). Effect of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) producing bacteria on in vitro rumen fermentation, biogenic amine production and anti-oxidation using corn meal as substrate. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 26 (6), 804.
- Lowe, J. A., Kershaw, S. J., Taylor, A. J. & Linforth, R. S. T. (1997). The effect of *Yucca schidigera* extract on canine and feline faecal volatiles occurring concurrently with faecal aroma amelioration. *Research in Veterinary Science*, 63 (1), 67-71.
- Maia, G. V. C., Saad, F. M. D. O. B., Roque, N. C., França, J., Lima, L. M. S. & Aquino, A. A. (2010). Zeólitas e *Yucca schidigera* em rações para cães: palatabilidade, digestibilidade e redução de odores fecais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 2442-2446.
- Martineau, B. & Laflamme, D. P. (2002). Effect of diet on markers of intestinal health in dogs. *Research in Veterinary Science*, 72 (3), 223-227.
- Marzocco, S., Piacente, S., Pizza, C., Oleszek, W., Stochmal, A., Pinto, A. & Autore, G. (2004). Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by yuccaol C from *Yucca schidigera* roezl. *Life Sciences*, 75 (12), 1491-1501.
- Matusiak, K., Oleksy, M., Borowski, S., Nowak, A., Korczyński, M., Dobrzański, Z. & Gutarowska, B. (2016). The use of *Yucca schidigera* and microbial preparation for poultry manure deodorization and hygienization. *Journal of Environmental Management*, 170, 50-59.
- McAllister, T. A., Annett, C. B., Cockwill, C. L., Olson, M. E., Wang, Y. & Cheeke, P. R. (2001). Studies on the use of *Yucca schidigera* to control giardiasis. *Veterinary Parasitology*, 97 (2), 85-99.
- Mcfarlane, J. M. & Metheney, C.D. (1988a). Effect of dietary Micro Aid on canine fecal odour. Report, Distributors Processing Inc., Porterville, California.
- Mcfarlane, J. M. & Metheney, C.D. (1988b). Effect of dietary Micro Aid on feline faecal odour. Report, Distributors Processing Inc, Porterville, California.
- Moore, J. G., Jessop, L. D. & Osborne, D. N. (1987). Gas-chromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor of human feces. *Gastroenterology*, 93 (6), 1321-1329.
- Nery, J., Biourge, V., Tournier, C., Leray, V., Martin, L., Dumon, H. & Nguyen, P. (2010). Influence of dietary protein content and source on fecal quality, electrolyte concentrations, and osmolarity, and digestibility in dogs differing in body size. *Journal of Animal Science*, 88 (1), 159-169.
- Oakenfull, D. G., Fenwick, D. E., Hood, R. L., Topping, D. L., Illman, R. L., & Storer, G. B. (1979). Effects of saponins on bile acids and plasma lipids in the rat. *British Journal of Nutrition*, 42(2), 209-216.
- Oleszek, W., Sitek, M., Stochmal, A., Piacente, S., Pizza, C. & Cheeke, P. (2001). Resveratrol and other phenolics from the bark of *Yucca schidigera* roezl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 747-752.
- Paray, B. A., El-Basuini, M. F., Alagawany, M., Albeshr, M. F., Farah, M. A. & Dawood, M. A. O. (2021). *Yucca schidigera* Usage for Healthy Aquatic Animals: Potential Roles for Sustainability. *Animals*, 11 (1), 93.
- Patel, S. (2018). *Yucca*: A medicinally significant genus with manifold therapeutic attributes. *Natural Products and Bioprospecting*, 2 (6), 231-234.
- Patra, A. K. & Saxena, J. (2009). The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutrition Research Reviews*, 22 (2), 204-219.
- Piacente, S., Pizza, C. & Oleszek, W. (2005). Saponins and phenolics of *Yucca schidigera* Roezl: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry Reviews*, 4, 177-

- 190.
- Pinna, C., Vecchiato, C. G., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M. T., Stefanelli, C., Grandi, M. & Biagi, G. (2017). An in vitro evaluation of the effects of a *Yucca schidigera* extract and chestnut tannins on composition and metabolic profiles of canine and feline faecal microbiota. *Archives of Animal Nutrition*, 71 (5), 395-412.
- Pinna, C., Vecchiato, C. G., Delsante, C., Grandi, M. & Biagi, G. (2021). On the Variability of Microbial Populations and Bacterial Metabolites within the Canine Stool. An in-Depth Analysis. *Animals*, 11 (1), 225.
- Preston, R. L., Bartle, S. J., May, T. & Goodall, S. R. (1987). Influence of sarsaponin on growth, feed and nitrogen utilization in growing male rats fed diets with added urea or protein. *Journal of Animal Science*, 65 (2), 481-487.
- Russell, W. R., Hoyles, L., Flint, H. J. & Dumas, M. E. (2013). Colonic bacterial metabolites and human health. *Current Opinion in Microbiology*, 16 (3), 246-254.
- Roque, N. C., Saad, F. M. D. O. B., Santos, J. P. F. D., Ebina, F. S., Chizzotti, A. F., Silva, R. C. & Maia, G. V. C. (2011). Increasing levels of zeolite and *Yucca schidigera* in diets for adult cats. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40 (11), 2471-2475.
- Roudebush, P. (2001). Flatulence: causes and management options. *Compendium*, 23 (12), 1075-82.
- Sahoo, S. P., Kaur, D., Sethi, A. P. S., Sharma, A. & Chandra, M. (2015). Evaluation of *Yucca schidigera* extract as feed additive on performance of broiler chicks in winter season. *Veterinary World*, 8 (4), 556.
- Sakurai, H., Kohsaka, H., Liu, M. F., Higashiyama, H., Hirata, Y., Kanno, K. & Miyasaka, N. (1995). Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *The Journal of Clinical Investigation*, 96 (5), 2357-2363.
- Santos, J. P. F., Saad, F. M. D. O. B., Ogoshi, R. C. S., Reis, J. S. D., Ferreira, L. G., Pires, C. P. & Brunetto, M. A. (2016). Inclusion of *Yucca schidigera* extract and zeolite in the diet and its relationship to the apparent digestibility of nutrients and urinary pH in adult dogs. *Ciência Rural*, 46 (8), 1456-1459.
- Sen, S., Makkar, M., Muetzel, M. & Becker, B. (1998). Effect of *Quillaja saponaria* saponins and *Yucca schidigera* plant extract on growth of *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, 27 (1), 35-38.
- Silvio, J., Harmon, D. L., Gross, K. L. & McLeod, K. R. (2000). Influence of fiber fermentability on nutrient digestion in the dog. *Nutrition*, 16 (4), 289-295.
- Tomlin, J., Lowis, C. & Read, N. W. (1991). Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut*, 32 (6), 665-669.
- Wang, Y., McAllister, T. A., Yanke, L. J. & Cheeke, P. R. (2000). Effect of steroidal saponin from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal of Applied Microbiology*, 88 (5), 887-896.
- Zúñiga-Serrano, A., Barrios-García, H. B., Anderson, R. C., Hume, M. E., Ruiz-Albarrán, M., Bautista-Martínez, Y. & Salinas-Chavira, J. (2022). Antimicrobial and Digestive Effects of *Yucca schidigera* Extracts Related to Production and Environment Implications of Ruminant and Non-Ruminant Animals: A Review. *Agriculture*, 12 (8), 1198.





**Ayşegül DAMLAPINAR<sup>1,a</sup>**  
**Kader YILDIZ<sup>2,b</sup>**

<sup>1</sup>Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

<sup>2</sup>Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Parazitoloji Anabilim Dalı, Kırıkkale

**ORCID<sup>a</sup>:** 0009-0005-9949-4534

**ORCID<sup>b</sup>:** 0000-0001-5802-6156

**\*Sorumlu Yazar:** Ayşegül DAMLAPINAR

**E-Posta:** ayseguldamlapinar@gmail.com

**Geliş Tarihi:** 24.02.2023

**Kabul Tarihi:** 29.04.2023

**14 (1): 25-35, 2023**

**DOI: 10.38137/vftd.1256030**

## **PROTOZOONLARIN VİRAL ENDOSİMBİYONTLARI**

**ÖZET.** Bazı parazitik protozoonlarda viral endosimbiontlar ve virüs benzeri partiküller keşfedilmiştir. Bunların protozoonlara etkisi ve konaktaki şekillenen enfeksiyondaki rolü dikkati çekmektedir. Viral endosimbiontların protozoonların konakta oluşturduğu patojeniteye katkısına dair bazı veriler mevcuttur. Bu derlemede; protozoonlarda bulunan viral endosimbiontlar hakkında bilgi vermek amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** *Cryptosporidium parvum virus*, *Giardia virus*, *Leishmania virus*, Protozoal virüsler, Viral endosimbiontlar.

## **VIRAL ENDOSYMBIONTS OF PROTOZOA**

**ABSTRACT.** Viral endosymbionts and virus-like particles have been detected in some parasitic protozoans. The effect of them on protozoa and their role in the infection in the host is remarkable. There are some data on the contribution of viral endosymbionts to the pathogenicity of protozoa in the host. It is aimed to give information about viral endosymbionts in protozoa in the review.

**Keywords:** *Cryptosporidium parvum virus*, *Giardia virus*, *Leishmania virus*, Viral endosymbionts, Viruses of protozoan.

### **Makale atıf**

Damlapınar, A. ve Yıldız, K. (2023). Protozoonların Viral Endosimbiontları, Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (1), 25-35. DOI: 10.38137/vftd.1256030

## GİRİŞ

Protozoonlar, helmintlerle birlikte insan ve hayvanlarda enfeksiyon şekillendiren parazitlerdir (Schurer ve ark., 2016). Protozoonlarla olan mücadelede günümüzde geliştirilmiş ilaçlar kullanılmaktadır, bunun yanı sıra bakteriyal virusler (bakteriyofajlar) ve malign hücreler için litik aktiviteye sahip virusler (onkolitik virusler) değerlendirildiğinde parazitik protozoonların mücadelesinde viruslerin kullanımı akla gelmiştir (Keen, 2013; Gündoğdu ve Ulu-Kılıç, 2018; Salman ve Dinçkal, 2022). Bu konudaki ilk bilgiler *Entamoeba histolytica*'dan virus benzeri partiküllerin (VLP: genetik materyali olmayan virus yapısal proteinleri) keşfi ile elde edilmiştir (Diamond ve Mattern, 1976).

Virus; genomunda DNA ya da RNA taşıyan, enerji ve protein sentezinde gerekli organellere sahip olmadığı için viruse duyarlı canlı bir hücreye gereksinim duyan enfeksiyöz etken olarak tanımlanır. Virusun temel yapısını bir nükleik asit ile bunu çevreleyen protein kılıf (kapsit) oluşturur. Virusler taşıdıkları genom özelliğine göre DNA ya da RNA virusleri olarak sınıflandırılır. RNA virusleri tek (ss) ya da çift (ds) iplikçik özelliğinde, zarflı ya da zarfsız ve nükleik asitin polaritesine göre pozitif veya negatif anlamlı olabilmektedir. Özellikle RNA virusleri genomik değişikliklere daha açık olması sebebiyle yeni virus ve konak adaptasyonlarına sahip olabilmektedirler (Yeşilbağ, 2010).

Endosimbiont terimi ise bir türe ait üyelerin farklı bir türde hücre içi ya da hücre dışı yaşaması olarak tanımlanmaktadır (Margulis ve Chapman, 2010). Protozoon parazitlerin bilinen viral endosimbiontları; Totiviridae, Partitiviridae, Narnaviridae'nin içerdiği üyeleri tanımlamaktadır. Totiviridae ailesi içinde protozoonları enfekte eden virusler sırasıyla *Leishmaniovirus*, *Giardiavirus*, *Trichomonasvirus*'tur. Partitiviridae içinde *Cryptosporidium parvum virus 1* (Hillman ve Cohen, 2021), Narna benzeri virus olan *Matryoshka RNA virus* türleri (Charon ve ark., 2019; Rodrigues ve ark., 2022), Totiviridae ailesine benzerlikleri bulunan *Eimeriavirus* türleri (Xin ve ark., 2016), Yaraviridae ailesine eklenen *Yaravirus* de endosimbiont yaşamaktadır (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2022). Bu derlemenin amacı çeşitli protozoonlarda bulunan ve viral endosimbiont olarak tanımlanan virusler hakkında bilgi vermektir.

## *Leishmania virus*

*Leishmania* türleri insan, köpek, kedi ve kemiricilerde leishmaniosis sebepleri olan zoonoz karakterde protozoonlardır (Karaer ve Nalbantoğlu, 2015). Phlebotominae alt ailesinde yer alan *Lutzomyia* ve *Phlebotomus* cinsi kum sinekleri bu parazite vektörlük yapmaktadır (Yaman, 2015). *Leishmania* spp. yaşam siklusu omurgalı konak ve vektör kum sinekleri arasında geçmektedir (Rodriguez ve ark., 2018). Parazitin amastigot ve promastigot olmak üzere iki formu bulunmaktadır (Mahmud ve ark., 2017). Amastigot, memeli konakların makrofajlar, monositler ve Langerhans hücreleri dahil olmak üzere mononükleer fagositik sistem hücrelerinde ve promastigot formu kum sineklerinin sindirim sisteminde ve in vitro kültür ortamında bulunur (Rodriguez ve ark., 2018).

*Leishmania braziliensis guyanensis*'in farklı izolatlarında virus varlığı bildirilmiştir (Tarr ve ark., 1988). Farklı *Leishmania* türlerinde de virusun varlığı doğrulanmıştır (Guilbride ve ark., 1992). Patterson ve ark. (1992), bu virüsü *Leishmania RNA virus 1* olarak (LRV1) olarak adlandırmış ve Totiviridae ailesine dahil etmiştir. *Leishmania aethiopica*, *Leishmania major* ve *Leishmania tropica* türlerinde bulunan virus ise *Leishmania RNA virus 2* (LRV2) olarak adlandırılmıştır (Scheffter ve ark., 1995; Zangger ve ark., 2014; Hajjarian ve ark., 2016). Türkiye'de *Leishmania tropica* suşlarından ilk kez LRV2'nin tespiti yapılmıştır (Nalçacı ve ark., 2019). LRV2'nin LRV1 izolatlarından immünolojik olarak farklı olduğu belirtilmiştir (Cadd ve ark., 1993). Bu parazite ait suşların coğrafi kökeni dikkate alındığında LRV ile *Leishmania* suşunun birlikte evrimleştiği düşünülmektedir (Widmer ve Dooley, 1995). *Leishmania* spp.'ye hücre çoğalması esnasında LRV'nin bulaştığı düşünülmüştür, LRV partiküllerinin parazite ait eksozomlarda da bulunduğunu belirlenmiştir (Atayde ve ark., 2019).

*Leishmania* RNA viruslarına dair 1998-2022 yılları arasında yapılan araştırmaları içeren meta-analizde 25 çalışma yer almış olup örneklerin %40,1'inde LRV pozitifliği belirtilmiştir (Shita ve ark., 2022). LRV aktif ve iyileşen lezyonlardan ve skarlardan da izole edilmiştir (Shita ve ark., 2022; Valencia ve ark., 2022). Mukokutanöz leishmaniosis esnasında konakta şekillenen tablo parazitin sitoplazmasındaki LRV'nin varlığı ile ilişkilendirilmiştir. Fareler üzerinde yapılan çalışma sonucunda virus ile enfekte parazitlerin daha immunojen olduğu tespit

edilmiştir. Bu virusların enfekte insanlarda inflamatuvar sitokin IL-17A salınımının etkilendiği, LRV ve kronik tablo gelişimi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hasta insanlarda LRV1 ve IL-17A'nın mukokutanöz leishmaniasis tespitinde belirteç olarak kullanılabilceği bildirilmiştir (Hartley ve ark., 2016). LRV pozitif parazit ile enfekte olmuş insanlarda hastalığın daha kolay nüks ettiği rapor edilmiştir. Peru ve Bolivya'da leishmaniasis yönünden başarı ile tedavi edilemeyen hastalarda LRV varlığının araştırıldığı bir çalışmada; LRV taşıyan parazit ile enfekte olanların sayısının fazla olduğu ve bu durumun tedavi başarısızlığı ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Adaui ve ark., 2016).

Virus, leishmaniasis esnasında konakta şekillenen yangıyı; parazit yükünü ve lezyon boyutunu artırarak şiddetlendirmektedir (Castiglioni ve ark., 2017). Virusun patolojiyi şiddetlendirmede kullandığı mekanizma; viral dsRNA'nın Toll benzeri reseptör (TLR-3) aracılığıyla tanınmasına ve pro-inflamatuvar sitokinler ile kimokinlerin üretimine bağlıdır (Zangger ve ark., 2014). Ayrıca LRV, makrofajlardaki apoptozisi engeller ve böylelikle parazitin konakta devamlılığını sağlar (Eren ve ark., 2016). *Leishmania major*'de bulunan LRV2, parazitin hayatta kalması ve şekillendirdiği patogeneze yer alan birtakım faktörlerin (Glikoprotein63-gp63, Isı şok proteini-hsp70 ve Sistein proteaz b-cpb) gen ekspresyonları üzerinde artırıcı bir etkiye sahip olabileceği kaydedilmiştir (Rahmanipour ve ark., 2023). Aynı çalışmanın devamında THP-1 (Tamm-Horsfall Protein 1) makrofojlarının LRV2 pozitif parazitler ile enfeksiyonu sonucunda, konaktaki enfeksiyonda önemli olan bazı sitokinlerin (IL-8, IL-1 $\beta$  ve IL12) gen ekspresyonlarını azaltabileceği, viral endosimbiontun parazitin hayatta kalması ve leishmaniasis şiddetine etki edebileceği belirtilmiştir (Rahmanipour ve ark., 2023).

Virusun eliminasyonu için, higromisin B ve 2'-C-metiladenozinin (2CMA) gibi farklı stratejiler denenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir (Ro ve ark., 1997; Saura ve ark., 2022). Virus inhibitörü olarak kullanılan nükleosid analoglarının, LRV1 taşıyan parazit ile enfekte kişilerin tedavisi esnasında uygulanması sonucunda virus düzeyinde güçlü bir düşüş sağladığı kaydedilmiştir (Kuhlmann ve ark., 2017). Viral endosimbiont LRV'nin kapsit kısmı kullanılarak üretilen aşının konakta parazit yükünü ve LRV taşıyan *Leishmania* spp. nin oluşturduğu patolojiyi azalttığı bulunmuştur (Castiglioni ve ark., 2017).

### *Cryptosporidium parvum virus 1*

*Cryptosporidium* spp. insan dahil birçok memeli hayvan ve kanatlılarda, ishale karakterize bir hastalık tablosu oluşturan protozoon parazitlerdir. Bulaşma *Cryptosporidium* spp. oositleri ile kontamine gıda ve suyun ağız yoluyla alınması ile gerçekleşir (Sevinç ve Dik, 2015). *Cryptosporidium parvum* izolatlarında çift sarmallı bir viruse rastlanılmıştır (Khramtsov ve ark., 1997). Uluslararası Virus Taksonomisi Komitesi (ICTV) bu virusu *Cryptosporidium parvum virus 1* (CSpV1) olarak tanımlanmış ve *Partitiviridae* ailesinden *Cryspovirus* cinsi içinde sınıflandırmıştır (Nibert ve ark., 2009). *Cryptosporidium*'un farklı türlerinde de (*C.hominis*, *C.felis*, *C.meleagridis*) CSpV1 benzer çift sarmallı RNA belirlenmiş olsa da henüz taksonomiye dahil edilmemiştir (Leoni ve ark., 2006).

CpV1, çevre koşullarına dirençli oositlerde bulunduğu belirlenmiş, diğer *Partitiviridae* üyelerindeki gibi bölünme ve gamet oluşumu esnasında hücre içi aktarıldığı düşünülmektedir (Khramtsov ve Upton, 2000; Jenkins ve ark., 2015). Virus genomlarının sekans sonuçları kıyaslandığında; CSpV1 ile *C. hominis*, *C. felis* ve *C. meleagridis* virusleri arasında farklılıkların olduğu, bu viruslerin belirli düzeyde konak özgüllüğüne sahip olabileceği ve bu nedenle *Cryspovirus* cinsinde birden fazla türün var olduğu öne sürülmektedir (Vong ve ark., 2017). Türkiye'de ishali buzağılardan elde edilen *C. parvum* oositlerinde CSpV1 %8,8 oranında rapor edilmiştir (Berber ve ark., 2021). CSpV1'e yönelik koloidal altın şeritler kullanılarak ruminant dışkı örneklerinden *C. parvum* teşhis edilmiş, bu virüsün parazit teşhisinde bir belirteç olarak kullanılabilceği belirtilmiştir. Ek olarak *C. hominis*'de bulunan virüsün de CSpV1'e benzer şekilde insanda parazit enfeksiyonu için belirteç olabileceği bildirilmiştir (Tai ve ark., 2019). Benzer amaçla yapılan başka bir çalışmada yeşil yapraklı bitkiler üzerindeki *C.parvum* oositlerini belirlemede CSpV1'in mükemmel bir hedef olduğu kaydedilmiştir (Kniel ve Jenkins, 2015). Suda bulunan *C. parvum* oositlerin 20 °C'de üç aylık süre sonunda enfektivitesini kaybettiği ancak virüs varlığını koruduğu ifade edilmiştir (Kniel ve ark., 2004). *Cryptosporidium parvum*'un farklı iki izolatu ile yapılan çalışmada CSpV1 bulundurma oranı ile oosit çıkışı arasında bir ilişki olabileceği düşünülmektedir (Jenkins ve ark., 2008).

***Giardia lamblia virus***

*Giardia lamblia* (*Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis*) insan başta olmak üzere kedi, köpek, çiftlik hayvanları, diğer evcil ve vahşi memeli türlerinde bulunan enterik bir protozondur. *Giardia lamblia* için farklı genotipler bildirilmiştir (Monis ve ark., 2009). Parazit kist ve trofozoit olarak iki farklı forma sahiptir, konaklar arasında bulaşmayı sağlayan kist formu, buna karşılık konakta hastalığın şekillenmesini sağlayan ise trofozoit formudur (Wangar ve ark., 2015). *Giardia lamblia* DNA çalışmaları sırasında çift sarmallı RNA'ya (dsRNA) sahip *Giardia lamblia virus* (GLV)'ün varlığı rapor edilmiştir (Wang ve Wang, 1986). Totiviridae ailesinde yer alan *Giardiavirus* cinsi içerisinde yer almaktadır (King ve ark., 2012). 1996 yılında *Giardia* trofozoitinde farklı kapsit büyüklüklerine sahip viruslerin bulunduğu ve bu viruslerin farklı *Giardiavirus*ler olduğu, trofozoitin birden fazla virus türü ile enfekte olduğu söylenmiştir (Tai ve ark.,1996). Bu bulguları destekler nitelikte bir araştırmada, viral genom ve enfeksiyonun şekli dikkate alınarak GLV'nin alt tiplerinin bulunduğunu kaydetmektedir (Marucci ve ark., 2021).

GLV'nün endositoz yolu ile parazitik protozoon içine alındığı tespit edilmiştir, virusun önce parazitin hücre duvarı üzerinde toplandığı daha sonra vakuol yardımı ile içeri alınarak sitoplazmaya dağıldığı belirlenmiştir (Tai ve ark., 1993). Ayrıca GLV'ün mikro veziküllerin oluşumunu uyardığı da düşünülmektedir. Virusun, trofozoitlerin dışında mikro veziküller içerisinde de tespit edilmesi bu görüşü desteklemektedir, üstelik virusun trofozoitten çıkış yolunun bu olduğu iddia edilmektedir (Marucci ve ark., 2021). *Giardia* izolatlarının hepsinin GLV'a duyarlı olmadığı ve bazılarında ilgili reseptörlerin eksikliğine bağlı olarak bu viruslara dirençli olduğu düşünülmektedir (Sepp ve ark., 1993).

GLV'ün bağırsak ve böbrek hücre kültürü içindeki sitopatik etkileri gözlenmemiştir (Wang ve ark., 1988). Ancak virusun artışına bağlı parazitin çoğalmasının durduğu kaydedilmiştir (Wang ve ark., 1988; Marucci ve ark., 2021). GLV'e karşı geliştirilen antiserumun viral genoma etkisinin zayıf olduğu, buna karşılık 100 kDa'luk kapsit proteinine karşı kuvvetli reaksiyon göstermiştir (Wang ve ark., 1988). GLV'ler *G. duodenalis* izolatları üzerinde, büyüme durması ve parazit lizisi dahil farklı sitopatik etkiler oluşturduğu gözlemlenmiştir (Wang ve Wang, 1986; Jonckheere ve Gordts, 1987). Ancak

rapor edilen bu etkilerin farklılıkları; virus miktarına ve çoğalma yeteneği gibi bazı faktörlere bağlı olabilir (Jonckheere ve Gordts, 1987). Bu faktörlerden birinin GLV'de yeni tanımlanmış olan GLV miRNA1 olabileceği ifade edilmiştir. Bu miRNA'nın virus kopya üretimi ile ilişkili olduğu kaydedilmiştir (Gong ve ark., 2020). Ayrıca konaktaki *G.duodenalis* enfeksiyonunda bu virus varlığının konağa ait proinflatuar sitokinlerin salgılanmasını arttırdığı bildirilmiştir (Pu ve ark., 2021). Yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre GLV ile enfekte *G.duodenalis* E genotipinde yeni bir RNA virusun varlığı bildirilmiş ve *Giardia duodenalis RNA virus 2* (GdRV-2) olarak ifade edilmiştir (Marucci ve ark., 2021).

***Eimeria virus***

*Eimeria spp.* farklı hayvan türlerinde genellikle sindirim sistemi hücrelerine yerleşerek coccidiosis olarak bilinen hastalığı şekillendirmektedir (Arslanhacacha ve Sarı, 2015). *Eimeria* türlerinde viral endosimbiontların keşfi *Eimeria stiedae* sporozoitlerinde virus benzeri partiküllerin (VLP: Virus like particle) belirlenmesi ile başlamış, yapılan RNA/RNA hibridizasyon deneylerinde *Giardia virus* ile aralarında güçlü bir ilişki tespit edilmiştir (Revets ve ark., 1989). Devam eden yıllarda da farklı *Eimeria* türlerinde (*Eimeria maxima*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria nieschulzi*, *E. acervulina*, *E. brunetti*) de virus benzeri partiküllerin varlığı bildirilmiştir (Ellis ve Revets, 1990; Roditi ve ark., 1994; Lee ve ark.,1996). Tanımlanan viral endosimbiontlar; *Eimeria stiedae* RNA virus 1 (EsRV1), *Eimeria necatrix virus*, *Eimeria tenella* RNA virus 1 (EtRV1) ve *Eimeria brunetti* RNA virus 1 (EbRV1)'dir (Cacho ve ark., 2001; Han ve ark., 2011; Xin ve ark., 2016; Wu ve ark., 2016). *Eimeria necatrix*'de bulunan viruslerin parazitin konağı olan tavuk hücrelerinde bulunmadığı ve hücre dışı enfeksiyonun şekillenmemesinden dolayı parazitler arasındaki viral enfeksiyonun hücre bölünmesi sırasında aktarıldığı düşünülmektedir (Cacho ve ark., 2001). Araştırmacılar Totiviridae ailesindeki üyeler ile benzerlikleri olduğunu için *Eimeria virus* olarak bu aile içinde tanımlanması gerektiğini düşünmektedir (Xin ve ark., 2016).

***Matryoshka RNA virus***

Hemosporidiyan protoozonlar olarak bilinen *Plasmodium*, *Leucocytozoon* ve *Haemoproteus* türleri; kuş, reptil ve memelilerde parazitlenen ve yaşamlarını omurgalı



ve omurgasız olmak üzere iki konakta devam ettiren hücre içi parazitlerdir (Levin ve Parker, 2012). Bu parazitlerdeki ilk viral kanıtlar maymun malarya etkeni olan *Plasmodium cynomolgi*'de bazı viral partiküllere rastlanması ile başlamıştır (Garnham ve ark., 1962). Yakın zamanda *Plasmodium vivax*'dan elde edilmiş olan iki parçalı, Narna benzeri ssRNA virus *Matryoshka RNA virus 1* (MaRNA-1) olarak isimlendirilmiştir. Bir virusun parazit içinde, parazitinde konak içinde bulunması araştırmacılar tarafından Rus oyuncak bebekleri olarak bilinen "matruşka" ya benzemesinden dolayı bu virusların isimlendirilmesinde kullanılmışlardır. *Plasmodium vivax*'dan *Matryoshka RNA virus 1* keşfi sırasında *Leucocytozoon* ile ilişkilendirilen virus *Matryoshka RNA virus 2* (MaRNA-2) olarak tanımlanmıştır (Charon ve ark., 2019). Çeşitli kuş türlerinde yapılan araştırmalar sonrasında *Leucocytozoon* parazitlerinde farklı bir tür olduğu düşünülen virus tanımlanmış ve önceki çalışma göz önüne alınarak *Matryoshka RNA virus 3* (MaRNA-3) olarak isimlendirilmiştir. *Haemoproteus* spp. de de virus varlığı bildirilmiş ve *Matryoshka RNA virus 4* (MaRNA-4) olarak tanımlanmıştır (Rodrigues ve ark., 2022).

### Yaravirus

*Acanthamoeba* soyuna ait türler toprakta ve suda serbet olarak yaşayan amipleri içermektedir. Serbest yaşayan bu amipler zaman zaman insanda granülomatöz amibik ensefalitis ve gözde keratitise neden olabilir (Yukarı, 2015). Amiplerde tanımlanan viruslerin büyük yapıda ve DNA virusu niteliğinde olduğu bildirilmiştir. *Acanthamoeba castellanii*'den tanımlanan *Yaravirus*'ün hücre kültüründe amip üzerinde litik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (Boratto ve ark., 2015).

### *Trichomonas vaginalis* virus

*Trichomonas vaginalis* insanlarda cinsel yolla bulaşan ve deneysel olarak farelerde de enfeksiyon oluşturabilen kamçılı bir protozoon parazittir (Lewis, 2014). *Trichomonas vaginalis*'de 1980'lerde çift iplikli RNA'ya rastlanılmıştır (Wang ve Wang, 1985). Tanımlanan ilk virus için tam uzunlukta genom sekansı rapor edilmiş (Tai ve Ip, 1995) ve *Trichomonas vaginalis* virus 1 (TVV1) Totiviridae ailesi içinde yer almıştır (Khanaliha ve ark., 2017). Filogenetik olarak TVV1, TVV2, TVV3 ve TVV4 olmak üzere dört tür bulunmaktadır (Khanaliha ve ark., 2017).

*Trichomonas vaginalis*'de TVV varlığı Türkiye'de %16,6 (Ertabaklar ve ark., 2021), Kore'de %14 (Kim ve ark., 2007), Güney Afrika'da %81,9 (Weber ve ark., 2003), ABD'de (Baltimore) %75 (Wendel ve ark., 2002), Filipinler'de %19 (Rivera ve ark., 2015), Güney Brezilya'da %90 (Becker ve ark., 2015), İran'da %17,39 (Heidary ve ark., 2013), Mısır'da %20 (El-Gayar ve ark., 2016), Kenya'da %43,5 (Masha ve ark., 2017) olarak belirlenmiştir.

Virusun parazitin içine endositoz yoluyla girdiği ve virusun protozoon üzerinde bazı litik etkiler oluşturduğuna dair kanıt bulunmaktadır (Benchimol ve ark., 2002). Parazitin TVV ile enfekte ve enfekte olmayan izolatları arasında yaklaşık 50 proteinde farklılık olduğu bildirilmiştir. Bu proteinlerin parazitin içerdiği metabolik enzimler, ısı şok proteini ve ribozomal proteinler olduğu tespit edilmiştir. Bu durum dikkate alındığında bu virusların parazitte şekillenen ilaç direncinin ve virusun virülansının anlaşılmasında yardımcı olacağı düşünülmektedir (He ve ark., 2017).

*Trichomonas vaginalis* virusu taşıyan protozoon izolatlarında temel immunojenetik protein olan p270 ekspresyonunun arttığı bildirilmiştir (Khoshnan ve Alderete, 1994). Parazitin hayatta kalmak için kullandığı virülens faktörlerinden olan sistein proteazlar, konağın hücresel molekülleri, vagina mukozasında bulunan IgA sekresyonunun bozulmasını ve konak hücrelerine tutunmayı sağlayarak enfeksiyonu şekillendirmektedir. TVV ile enfekte parazitlerde sistein proteaz ekspresyonunda değişiklik olmuş bu da parazitin virülensinin artmasını sağlamıştır (Provenzano ve ark., 1997). Ayrıca virus ile enfekte olan parazitlerin konak hücrelerine tutunmasının daha da arttığına dair bulgular mevcuttur (Fraga ve ark., 2012). TVV enfeksiyonu ve trichomoniasis semptomlarının şiddetlenmesi arasında pozitif bağlantı olduğu rapor edilmiştir (Fraga ve ark., 2007; El-Gayar ve ark., 2016).

Bazı klinik çalışmalarda *T. vaginalis* ile enfekte kişilerin yaşları ile virus taşıması arasında anlamlı bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Wendel ve ark., 2002). *T. vaginalis* virusunun konak enfeksiyonu ve doğal bağışıklık cevabının yıkımı üzerinde bir role sahip olduğu görülmektedir. TVV'ün insan hücrelerini enfekte edemediği ve burada çoğalma göstermemekle birlikte virus, konakta proinflatuar yanıtı düzenleyebilir, doğal bağışıklık reaksiyonlarını artırabilir ve böylece hastalığın



şiddeti ile klinik semptomları kötüleştirebilir. Viral dsRNA ve TVV partikülleri, vajinal hücreler üzerindeki reseptörler tarafından algılandığında, NF-κB aktivasyonu ile TLR3 (Toll benzeri reseptör) bağlı yollar aracılığıyla tetiklenerek antiviral yanıt için spesifik Tip1 interferon gen ekspresyonunu sağlamakta ve böylelikle konakta yangısal yanıtı güçlendirmektedir (Fichorova ve ark., 2012).

*Trichomonas vaginalis* izolatlarının metronidazole karşı direnci ile TVV varlığı arasında bir ilişki olduğu ileri sürülmesine rağmen, bu durum henüz netleşmemiştir (Snipes ve ark., 2000; Malla ve ark., 2011). TVV taşıyan *T. vaginalis* enfeksiyonuna bağlı erken doğum riskinden korunmak amacıyla uygulanan metronidazol tedavisini takiben gebe kadınlarda bu parazitlerin ölmesi sonucunda virusa ait dsRNA ve virionların vaginada salınımının artışı, yangısal yanıtı şiddetlendirmektedir. Yangının artışı ise klinik olarak tedavinin başarısız olduğu şeklinde yorumlanmaktadır (Thu ve ark., 2018). TVV teşhisi; TVV'ye özgü antikorlar ve TVV RNA'larını saptamak için geliştirilen immüno-tespit yöntemleri ile yapılabilmektedir (Alderete ve ark., 2003).

## SONUÇ

Protozoonların viral endosimbiontları oldukça yeni bir konudur ve önemli patojeniteye sahip farklı protozoonlar üzerinde çalışmalar arttıkça etkileri daha iyi anlaşılacaktır. Viral endosimbiontların anti-paraziter olarak kullanılmaları için henüz erken ve bu konuyla ilgili daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır. Viral endosimbiontlar; ilaç direnci geliştirmiş protozoonların tespiti ve bu protozoonlara karşı strateji geliştirmede iyi bir hedef olabilir.

## KAYNAKLAR

Adaui, V., Lye, L. F., Akopyants, N. S., Zimic, M., Llanos-Cuentas, A., Garcia, L., Maes, I., Doncker, S., Dobson, D. E., Arevalo, J., Dujardin, J. C. & Beverley, S. M. (2016). Association of the Endobiont Double-Stranded RNA Virus LRV1 With Treatment Failure for Human Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* in Peru and Bolivia. *The Journal of Infectious Diseases*, 213, 112-121.

Alderete, J. F., Wendel, K. A., Rompalo, A. M., Erbeling, E. J., Benchimol, M. & Chang, T. H. (2003).

*Trichomonas vaginalis*: evaluating capsid proteins of dsRNA viruses and the dsRNA virus within patients attending a sexually transmitted disease clinic. *Experimental Parasitology*, 103, 44-50.

- Arslan, M. Ö. & Sarı, B. (2015). Eimeriidae (Coccidiosis). N. Dumanlı ve Z. Karaer (Edt.), *Veteriner Protozooloji* (2.baskı), Ankara: Medisan Yayınevi, 77
- Atayde, A. V., Filho, A. S. L., Chaparro, V., Zimmermann, A., Martel, C., Jaramillo, M. & Olivier, M. (2019). *Nature Microbiology*, 4, 714-723.
- Becker, D. L., Santos, O., Frasson, A. P., Rigo, G. V., Macedo, A. J. & Tasca, T. (2015). High rates of Double-Stranded RNA Viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 181-187.
- Benchimol, M., Monteiro, S. P., Chang, T. H. & Alderete, J. F. (2002). Virus in *Trichomonas*—an ultrastructural study. *Parasitology International*, 51 (3), 293- 298.
- Berber, E., Şimşek, E., Çanakoğlu, N., Sürsal, N. & Gençay-Göksu, A. (2021). Newly identified *Cryptosporidium parvum* virus-1 from newborn calf diarrhoea in Turkey. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68 (4), 2571-2580.
- Boratto, P. V. M., Oliveira, G. P., Machado, T. B., Andrade, A. C. S. P., Baudoin, J. P., Klose, T., Schulz, F., Azza, S., Decloquemen, P., Chabrière, E., Colson, P., Levasseur, A., Scola, B. L. & Abrahao, J. S. (2020). Yaravirus: Bulaşan yeni bir 80-nm virus *Acanthamoeba castellanii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117 (28), 16579-16586.
- Cacho, E., Gallego, M., Montes., C., Lopez-Bernad, F., Quilez, J. & Sanchez-Acedo, C. (2001). Eimeria necatrix virus: intracellular localisation of viral particles and proteins. *International Journal for Parasitology*, 31, 1269-1274.
- Cadd, T. L., Keenan, M. C. & Patterson, J. L. (1993). Detection of *Leishmania* RNA virus 1 proteins. *Journal of Virology*, 67 (9), 5647-5650.
- Castiglioni, P., Hartley, M. A., Rossi, M., Prevel, F., Desponds, C., Utzschneider, D. T., Eren, R. O., Zangger, H., Brunner, L., Collin, N.,

- Zehn, D., Kuhlmann, F. M., Beverley, S. M., Fasel, N. & Ronet, C. (2017). Exacerbated Leishmaniasis Caused by a Viral Endosymbiont can be Prevented by Immunization with Its Viral Capsid. *Plos Neglected Tropical Diseases*, 11 (1), e0005240.
- Charon, J., Grigg, M J., Eden, J. S., Piera, K. A., Rana, H., William, T., Rose, K., Davenport, M. P., Anstey, N. M. & Holmes, E. C. (2019). Novel RNA viruses associated with *Plasmodium vivax* in human malaria and *Leucocytozoon* parasites in avian disease. *PLOS Pathogens*, 15 (12), e1008216.
- Diamond, L. S. & Mattern, C. F. T. (1976). Protozoal Viruses. *Advances in Virus Research*, 20, 87-112.
- El-Gayar, E. K., Mokhtar, A. B. & Hassan, W. A. (2016). Molecular characterization of double-stranded RNA virus in *Trichomonas vaginalis* Egyptian isolates and its association with pathogenicity. *Parasitology Research*, 115 (10), 4027-4036.
- Ellis, J. & Revets, H. (1990). *Eimeria* species which infect the chicken contain virus-like RNA molecules. *Parasitology*, 101 (2), 163.
- Eren, R. O., Reverte, M., Rossi, M., Hartley, M. A., Castiglioni, P., Prevel, F., Martin, R., Desponds, C., Lye, L. F., Drexler, S. K., Reith, W., Beverley, S. M., Ronet, C. & Fasel, N. (2016). Mammalian Innate Immune Response to a *Leishmania*-Resident RNA Virus Increases Macrophage Survival to Promote Parasite Persistence. *Cell Host & Microbe*, 20 (3), 318-328.
- Ertabaklar, H., Malatyali, E., Özün-Özbay, E. P., Yıldız, İ., Sinecen, M., Ertuğ, S., Bozdoğan, B. & Güçlü, Ö. (2021). Microsatellite-Based Genotyping, Analysis of Population Structure, Presence of *Trichomonas vaginalis* Virus (TVV) and *Mycoplasma hominis* in *T. vaginalis* Isolates from Southwest of Turkey. *Iranian Journal of Parasitology*, 16 (1), 81-90.
- Fichorova, R. N., Lee, Y., Yamamoto, H. S., Takagi, Y., Hayes, G. R., Goodman, R.P., Chepa-Lotrea, X., Buck, O. R., Murray, R., Kula, T., Beach, D. H., Singh, B. N. & Nibert, M. L. (2012). Endobiont Viruses Sensed by the Human Host—Beyond Conventional Antiparasitic Therapy. *Plos One*, 7 (11), e48418.
- Fraga, J., Rojas, L., Sarioego, I. & Fernández-Calienes, A. (2012). Genetic characterization of three Cuban *Trichomonas vaginalis* virus. Phylogeny of *Totiviridae* family. *Infection, Genetics and Evolution*, 12 (1), 113-120.
- Fraga, J., Rojas, L., Sarioego, I. & Fernández-Calienes, A. & Núñez, F. A. (2007). Double-Stranded RNA Viral Infection of *Trichomonas vaginalis* and Association with Clinical Presentation. *Acta Parasitologica*, 46, 93-98.
- Garnham, P. C. C., Bird, R. G. & Baker, J. R. (1962). Electron microscope studies of motile stages of malaria parasites: III. The ookinetes of *Haemamoeba* and *Plasmodium*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 56 (2), 116-120.
- Gong, P., Li, X., Wu, W., Cao, L., Zhao, P., Li, X., Ren, B., Li, J. & Zhang, X. (2020). A novel microRNA from the translated region of the *Giardiavirus* rdrp gene governs virus copy number in *Giardia duodenalis*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 569412.
- Guilbride, L., Myler, P. J. & Stuart, K. (1992). Distribution and sequence divergence of LRV1 viruses among different *Leishmania* species. *Mol Biochem Parasitol*, 54 (1), 101-104.
- Gündoğdu, A. & Ulu-Kılıç, A. (2018). Bakteriyofaj Terapisi: Unutulmuş Bir Şifa Kaynağı. *Klinik Dergisi*, 31 (2), 78-87.
- Hajjaran, H., Mahdi, M., Mohebbali, M., Samimi-Rad, K., Ataei-Pirkooh, A., Kazemi-Rad, E., Naddaf, S. R. & Raoofian, R. (2016). Detection and molecular identification of *Leishmania* RNA virus (LRV) in Iranian *Leishmania* species. *Archives of Virology*, 161 (12), 3385-3390.
- Han, Q., Li, J., Gong, P., Gai, J., Li, S. & Zhang, X. (2011). Virus-like particles in *Eimeria tenella* are associated with multiple RNA segments. *Experimental Parasitology*, 127, 646-650.
- Hartley, M. A., Bourreau, E., Rossi, M., Castiglioni, P., Eren, R. O., Prevel, F., Couppié, P., Hickerson, S. M., Launois, P., Beverley, S. M., Ronet, C. & Fasel, F. (2016). Leishmanivirus-Dependent Metastatic Leishmaniasis Is Prevented by Blocking IL-17A. *Plos Pathogens*, 12 (9), e1005852.

- He, D., Pengtao, G., Ju, Y., Jianhua, L., He, L., Guocai, Z. & Xichen, Z. (2017). Differential Protein Expressions in Virus-Infected and Uninfected *Trichomonas vaginalis*. The Korean Journal of Parasitology, 55 (2), 121-128.
- Heidary, S., Bandehpour, M., Valadkhani, Z., Seyyed-Tabaee, S. J., Haghghi, A., Abadi, A. R. & Kazemi, B. (2013). Double-Stranded RNA Viral Infection in Tehran *Trichomonas vaginalis* Isolates. Iranian Journal of Parasitology, 8 (1), 60-64.
- Hillman, B. I. & Cohen A. B., (2021). Totiviruses (*Totiviridae*). Encyclopedia of Virology (4.baskı), Academic Press; Pp: 648-657.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (2022). [https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode\\_id=202112530](https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202112530) (Erişim: 20.12.2022).
- Jenkins, M. C., Higgins, J., Abrahante, J. E., Kniel, K. E., O'Brien, C., Trout, J., Lancto, C. A., Abrahamsen, M. S. & Fayer, R. (2008). Fecundity of *Cryptosporidium parvum* is correlated with intracellular levels of the viral symbiont CPV. International Journal for Parasitology, 38, 1051-1055.
- Jenkins, M. C., O'Brien, C. N. & Fayer, R. (2015). Changes in the levels of Crysopovirus during in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology Research, 114, 2063-2068.
- Jonckheere, J. F. & Gordts, B. (1987). Occurrence and transfection of a Giardia virus. Molecular and Biochemical Parasitology, 23 (1), 85-89.
- Kar, S., Güven, E. & Karaer, Z. (2015). Hexamitidae. Genel Protozooloji. N. Dumanlı ve Z. Karaer (Edt.), Veteriner Protozooloji (2.baskı), 45-51. Ankara: Medisan Yayınevi.
- Karaer, Z. & Nalbantoğlu, S. (2015). Trypanosomatidae. N. Dumanlı ve Z. Karaer (Edt.), Veteriner Protozooloji (2.baskı), Ankara: Medisan Yayınevi; Pp: 35-42.
- Keen, E. C. (2013). Beyond phage therapy: Virotherapy of protozoal diseases. Future Microbiology, 8 (7), 821-823.
- Khanaliha, K., Masoumi-Asl, H., Bokharaei-Salim, F., Tabatabaei, A. & Naghdalipoor, M. (2017). Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* (TVV1) in Iranian isolates. Microbial Pathogenesis, 109, 56-60.
- Khoshnan, A. & Alderete, J. F. (1994). *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. Journal of Virology, 68 (6), 4035-4038.
- Khramtsov, N. V. & Upton, S. J. (2000). Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system. Journal of Virology, 74 (13), 5788-5795.
- Khramtsov, N. V., Woods, K. M., Nesterenko, M. V., Dykstra, C. C. & Upton, S. J. (1997). Virus-like, double-stranded RNAs in the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum*. Molecular Microbiology, 26 (2), 289-300.
- Kim, J. W., Chung, P. R., Hwang, M. K. & Choi, E. Y. (2007). Double-stranded RNA virus in Korean Isolate IH-2 of *Trichomonas vaginalis*. The Korean Journal of Parasitology, 45 (2), 87-94.
- King, A. M., Adams, M. J., Lefkowitz, E. J. & Carstens, E. B. (2012). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier.
- Kniel, K. E., Higgins, J. A., Trout, J. M., Fayer, R. & Jenkins, M. C. (2004). Characterization and potential use of a *Cryptosporidium parvum* virus (CPV) antigen for detecting *C. parvum* oocysts. Journal of Microbiological Methods, 58 (2), 189-195.
- Kniel, K. E. & Jenkins, M. C. (2005). Detection of *Cryptosporidium parvum* Oocysts on Fresh Vegetables and Herbs Using Antibodies Specific for a *Cryptosporidium parvum* Viral Antigen. Journal of Food Protection, 68 (5), 1093-1096.
- Kuhlmann, F. M., Robinson, J. I., Bluemling, G. R., Ronet, C., Fasel, N. & Beverley, S. M. (2017). Antiviral screening identifies adenosine analogs targeting the endogenous dsRNA *Leishmania* RNA virus 1 (LRV1) pathogenicity factor. Proceedings of the National Academy of Sciences, 114 (5), E811-E819.
- Lee, S., Fernando, M. A. & Nagy, E. (1996). dsRNA associated with virus-like particles in *Eimeria* spp. of the domestic fowl. Parasitology research,

- 82, 518-523.
- Leoni, F., Gallimore, C. I., Green, J. & McLauchlin, J. (2006). Characterisation of small double stranded RNA molecule in *Cryptosporidium hominis*, *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium meleagridis*. *Parasitology International*, 55 (4), 299-306.
- Levin, I. I. & Parker, P. G. (2012). Haemosporidian Parasites: Impacts on Avian Hosts. R. E. Miller & M. E. Fowler (Edt.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy* (7.baskı). Elsevier Saunders; Pp: 356.
- Lewis, D. (2014). Trichomoniasis. *Medicine*, 42 (7), 369-371.
- Mahmud, R., Lim, Y. A. L. & Amir, A. (2017). Hemoflagellates. *Medical Parasitology*. Cham: Springer; Pp: 32-38.
- Malla, N., Kaul, P., Sehgal, R. & Gupta, I. (2011). The presence of dsRNA virus in *Trichomonas vaginalis* isolates from symptomatic and asymptomatic Indian women and its correlation with in vitro metronidazole sensitivity. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 29 (2), 152-157.
- Margulis, L. & Chapman, M. J. (2010). Kingdoms and Domains: An Illustrated Guide to the Phyla of Life on Earth. Academic Press, 493.
- Marucci, G., Zullino, I., Bertuccini, L., Camerini, S., Cecchetti, S., Pietrantoni, A., Casella, M., Vatta, P., Greenwood, A. D., Fiorillo, A. & Lalle, M. (2021). Re-Discovery of Giardiavirus: Genomic and Functional Analysis of Viruses from *Giardia duodenalis* Isolates. *Biomedicines*, 9 (6), 654.
- Masha, S. C., Cools, P., Crucitti, T., Sanders, E. J. & Vaneechoutte, M. (2017). Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by actin gene sequence analysis and carriage of *T. vaginalis* viruses. *Parasites & Vectors*, 10 (1), 537.
- Monis, P. T., Caccio, S. M. & Andrew Thompson, R. C. (2009). Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends in Parasitology*, 25 (2), 93-100.
- Nalçacı, M., Karakuş, M., Yılmaz, B., Demir, S., Özbilgin A., Özbel, Y. & Töz, S. (2019). Detection of *Leishmania* RNA virus 2 in *Leishmania* species from Turkey. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 113, 410-417.
- Nibert, M. L., Woods, K. M., Upton, S. J. & Ghabrial, S. A. (2009). Crysposvirus: a new genus of protozoan viruses in the family Partitiviridae. *Archives of Virology*, 154, 1959-1965.
- Provenzano, D., Khoshnan, A. & Alderete, J. F. (1997). Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Archives of Virology*, 142, 939-952.
- Pu, X., Li, X., Cao, L., Yue, K., Zhao, P., Wang, X., Li, J., Zhang, X., Zhang, N., Zhao, Z., Liang, M. & Gong, P. (2021). *Giardia duodenalis* Induces Proinflammatory Cytokine Production in Mouse Macrophages via TLR9-Mediated p38 and ERK Signaling Pathways. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 1-12.
- Rahmanipour, M., Mohebbi, M., Koosha, M., Kazemirad, E., Yasami-Khiabani, S., Mirjalali, H. & Hajjaran, H. (2022). Effect of *Leishmania* RNA virus 2 on virulence factors and cytokines gene expression in a human macrophage infected with *Leishmania major*: A preliminary study. *Experimental Parasitology*, 108459.
- Revets, H., Dekegel, D., Deleersnijder, W., De Jonckheere, J., Peeters, J., Leysen, E. & Hamers, R. (1989). Identification of virus-like particles in *Eimeria stiedae*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36 (3), 209-215.
- Ro, Y. T., Scheffter, S. M. & Patterson, J. L. (1997). Hygromycin B resistance mediates elimination of *Leishmania* virus from persistently infected parasites. *Journal of Virology*, 71 (12), 8991-8998.
- Roditi, I., Wyler, T., Smith, N. & Braun, R. (1994). Virus-like particles in *Eimeria nieschulzi* are associated with multiple RNA segments. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63 (2), 275-282.
- Rodrigues, J. R., Roy, S. W. & Sehgal, R. N. (2022). Novel RNA viruses associated with avian haemosporidian parasites. *Plos one*, 17 (6), e0269881.
- Rodriguez, A. E., Estévez, J. O., Nevot, M. C., Barrios, A. & Florin-Christensen, M. (2018). M. Florin-Christensen ve L. Schnittger (Edt.), *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*, Cham:

- Springer; Pp: 287-307.
- Rivera, W. L., Justo, C. A. C., Diego, M. A. C. V. & Loyola, L. M. (2015). Detection and molecular characterization of double-stranded RNA viruses in Philippine *Trichomonas vaginalis* isolates. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, 50 (5), 669-676.
- Salman, T. & Dinçkal, Ç. (2022). Kanser ve İmmünoterapi. H. Koçdor, A. Pabuççuoğlu, F. Zihnioğlu ve F. Sağın (Edt.), Sağlık Biyoteknolojisi, (1.Baskı). Ankara. Pp: 78-84.
- Saura, A., Zakharova, A., Klocek, D., Gerasimov, E. S., Butenko, A., Macedo, D. H., Servienè, E., Zagirova, D., Meshcheryakova, A., Rogozin, I. B., Serva, S., Kostygov, A. Y. & Yurchenko, V. (2022). Elimination of LRVs elicits different responses in *Leishmania* spp. *Mosphere*, 7 (4), e00335-22.
- Sepp, T., Wang, A. L. & Wang, C. C. (1993). Giardivirus-Resistant *Giardia lamblia* Lacks a Virus Receptor on the Cell Membrane Surface. *Journal of Virology*, 68 (3), 1426-1431.
- Sevinç, F. & Dik, B. (2015). Cryptosporidiidae. N. Dumanlı ve Z. Karaer (Edt.), *Veteriner Protozooloji* (2.baskı). Ankara: Medisan Yayınevi; Pp: 125-126.
- Scheffter, S. M., Ro, Y. T., Chung, I. K. & Patterson, J. L. (1995). The complete sequence of *Leishmania* RNA virus LRV2-1, a virus of an Old World parasite strain. *Virology*, 212 (1), 84-90.
- Schurer, J. M., Mosites, E., Li, C., Meschke, S. & Rabinowitz, P. (2016). Community-based surveillance of zoonotic parasites in a 'One Health' world: a systematic review. *One Health*, 2, 166-174.
- Shita, E. Y., Semegn, E. N., Wubetu, G. Y., Abitew, A. M., Andualem, B. G. & Alemneh, M. G. (2022). Prevalence of *Leishmania* RNA virus in *Leishmania* parasites in patients with tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16 (6), e0010427.
- Snipes, L. J., Gamard, P. M., Narcisi, E. M., Beard, C. B., Lehmann, T. & Secor, W. E. (2000). Molecular Epidemiology of Metronidazole Resistance in a Population of *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38 (8), 3004-3009.
- Tai, J. H., Chang, S. C., Chou, C. F. & Ong, S. J. (1996). Separation and characterization of two related Giardaviruses in the parasitic protozoan *Giardia lamblia*. *Virology*, 216 (1), 124-132.
- Tai, J. H. & Ip, C. F. (1995). The cDNA Sequence of *Trichomonas vaginalis* Virus-T1 Double-Stranded RNA. *Virology*, 206 (1), 773-776.
- Tai, L., Li, J., Yin, J., Zhang, N., Yang, J., Li, H., Yang, Z., Gong, P. & Zhang, X. (2019). A novel detection method of *Cryptosporidium parvum* infection in cattle based on *Cryptosporidium parvum* virus 1. *Acta Biochim Biophys Sin*, 51 (1), 104-111.
- Tai, J. H., Ong, S. J., Chang, S. C. & Su, H. M. (1993). Giardavirus enters *Giardia lamblia* WB trophozoite via endocytosis. *Experimental Parasitology*, 76 (2), 165-174.
- Tarr, P. I., Aline, R. F., Smiley, B. L., Scholler, J. & Keithly, J. (1988). LR1: A candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 9572-9575.
- Thu, T. T. T., Margarita, V., Cocco, A. R., Marongiu, Dessì, D., Rappelli, P. & Fiori, P. L., (2018). *Trichomonas vaginalis* Transports Virulent *Mycoplasma hominis* and Transmits the Infection to Human Cells after Metronidazole Treatment: A Potential Role in Bacterial Invasion of Fetal Membranes and Amniotic Fluid. *Journal of Pregnancy*.
- Valencia, B. M., Lau, R., Kariyawasam, R., Jara, M., Ramos, A. P., Chantry, M., Lana, J. T., Boggild, A. K. & Llanos-Cuentas, A. (2022). *Leishmania* RNA virus-1 is similarly detected among metastatic and non-metastatic phenotypes in a prospective cohort of American tegumentary leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 16 (1), e0010162.
- Vong, M., Ludington, J. G., Ward, H. D. & Nibert, M. L. (2017). Complete cryspovirus genome sequences from *Cryptosporidium parvum* isolate Iowa. *Archives of Virology*, 162, 2875-2879.
- Wang, A. L., Miller, R. L. & Wang, C. C. (1988). Antibodies to the *Giardia lamblia* double-stranded RNA virus major protein can block the viral infection. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 30 (3),



225-232.

Wang, A. L. & Wang, C. C. (1985). A Linear Double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. The Journal of Biological Chemistry, 260 (6), 3697-3702.

Wang, A. L. & Wang, C. C. (1986). Discovery of a specific double-stranded RNA virus in *Giardia lamblia*. Molecular and Biochemical Parasitology, 21, 269-276.

Weber, B., Mapeka, T. M., Maahlo, M. A. & Hoosen, A. A. (2003). Double stranded RNA virus in South African *Trichomonas vaginalis* isolates. Journal of Clinical Pathology, 56 (7), 542-543.

Wendel, K. A., Rompalo, A. M., Erbeling, E. J., Chang, T. H. & Alderete, J. F. (2002). Double-Stranded RNA Viral Infection of *Trichomonas vaginalis* Infecting Patients Attending a Sexually Transmitted Diseases Clinic. The Journal of Infectious Diseases, 186 (4), 558-561.

Widmer, G. & Dooley, S. (1995). Phylogenetic analysis of Leishmania RNA virus and Leishmania suggests ancient virus-parasite association. Nucleic Acids Research, 23 (12), 2300-2304.

Wu, B., Zhang, X., Gong, P., Li, M., Ding, H., Xin, C., Zhao, N. & Li, J. (2016). Eimeria tenella: A novel dsRNA virus in E. tenella and its complete genome sequence analysis. Virus Genes, 52, 244-252.

Xin, C., Wu, B., Li, J., Gong, P., Yang, J., Li, H., Cai, X. & Zhang, X. (2016). Complete genome sequence and evolution analysis of Eimeria stiedai RNA virus 1, a novel member of the family Totiviridae. Arch Virol, 161, 3571-3576.

Yaman, M. (2015). Phlebotominae (Kum Sinekleri). Z. Karaer ve N. Dumanlı (Edt.), Arthropodoloji. Ankara: Medisan Yayınevi; Pp:187.

Yeşilbağ, K. (2010). Genel Viroloji. Malayta: Medipres Matbaacılık; Pp: 3-24.

Yukarı, B. A. (2015). Entamoebidae, Hartmannellidae, Vahlkampfiidae. N. Dumanlı ve Z. Karaer (Edt.), Veteriner Protozooloji (2.baskı). Ankara: Medisan Yayınevi; Pp: 73.

Zangger, H., Hailu, A., Desponds, C., Lye, L. F., Akopyants, N. S., Dobson, D. E., Ronet, C., Ghalib, H., Beverley, S. M. & Fasel, N. (2014). Leishmania aethiopica field isolates bearing an endosymbiotic dsRNA virus induce pro-inflammatory cytokine response. PLoS Neglected Tropical Diseases, 8 (4), e2836.



**Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni**  
**Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association**  
**e-ISSN: 2667-8381**

**İshak GÖKÇEK<sup>1a</sup>**  
**Leyla AYDIN<sup>2b</sup>**

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi  
Veteriner Fakültesi Fizyoloji A.D, Hatay  
<sup>2</sup>Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi  
Tıp Fakültesi Fizyoloji A.D, Ankara

**ORCID<sup>a</sup>:** 0000-0002-0590-6405  
**ORCID<sup>b</sup>:** 0000-0001-8771-5030

**\*Sorumlu Yazar:** İshak GÖKÇEK  
**E-Posta:** ishakgokcek@hotmail.com

**Geliş Tarihi:** 19.12.2022  
**Kabul Tarihi:** 01.05.2023

**14 (1): 36-48, 2023**  
**DOI: 10.38137/vftd.1221071**

**Makale atfı**

Gökçek, İ. ve Aydın, L. (2023). Investigation of the Role of Stress in Male Infertility and The Effect of Current Melatonin Hormone Treatments, *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 14 (1), 36-48. DOI: 10.38137/vftd.1221071

**ERKEK İNFERTİLİTESİNDE STRESİN ROLÜ VE UYGULANAN GÜNCEL MELATONİN HORMON TEDAVİLERİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**ÖZET.** Psikolojik, fizyolojik, sosyal hatta çevresel kaynaklı nedenlerle canlıda ki homeostatik mekanizmalarda meydana gelen bozulmalar şeklinde tanımlanan stres kavramı üzerinde 17 yüzyıldan bu yana bahsedilmekle birlikte modern yaşamda sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Öyle ki ev, iş yaşamından tutun sokakta, trafikte yaşamın herhangi bir anında strese maruz kalılabilmektedir. Bu durum stresi modern yaşamın bir parçası haline getirmiştir. Yakın birini kaybı, işyeri stresi hatta COVID 19 pandemisinde bireylerin evlerde izole bir şekilde yaşamı gibi herhangi bir durum veya olay da stres kaynağı olabilmektedir. Strese uyarana karşı canlıda meydana gelen yanıtlar belirli bir düzeye kadar canlının faydasına yöneliktir. Ancak stres uyarının süresi ve şiddetinin artması durumlarında tüm fizyolojik sistemlerde patolojik durumlar şekillenmektedir. Uzun süreli stres maruziyeti, sperm kalitesi, sperm konsantrasyonu, spermatozoit sayısı, sperm yüzdesi gibi sperm parametrelerinde azalmalara neden olarak erkeklerde infertiliteye yol açabilmektedir. Stresin üreme sistemindeki bu olumsuz etkilerini azaltmak adına çeşitli maddeler araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda melatoninin antioksidan, anti-inflamatuar, anti-apoptik vb. mekanizmalar ile erkek infertilitesinde olumlu etkinlik göstermektedir. Bu derlemede stresin erkek üreme sistemi üzerine etkisi ve melatonin ilişkisi üzerinde bilgi verilmesi amaçlanmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Erkek infertilitesi, Melatonin, Sperm, Stres.

**INVESTIGATION OF THE ROLE OF STRESS IN MALE INFERTILITY AND THE EFFECT OF CURRENT MELATONIN HORMONE TREATMENTS**

**ABSTRACT.** Although stress, defined as the deterioration in homeostatic mechanisms in living things due to psychological, physiological, social, and even environmental reasons, has been mentioned since the 17th century, it is frequently encountered in modern life. So much so that you can be exposed to stress anytime, from home, business life, to the street, in traffic. This situation has made stress a part of modern life. Any situation or event, such as losing a close person, workplace stress, or even living in isolation at home during the coronavirus disease (COVID-19) pandemic, can also be a source of stress. Responses that occur in the organism to the stress stimulus are for the benefit of the organism up to a certain level. However, when the duration and intensity of the stress stimulus increase, pathological conditions occur in all physiological systems. Long-term exposure to stress may cause infertility in men by causing decreases in sperm parameters such as sperm quality, sperm concentration, spermatozoid count, and sperm percentage. Various substances are being researched to reduce these adverse effects of stress on the reproductive system. Studies have shown that melatonin has antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and so on. It shows positive efficacy in male infertility with various mechanisms. This review it is aimed to give information on the effect of stress on the male reproductive system and the relationship between melatonin.

**Keywords:** Male infertility, Melatonin, Sperm, Stress.

## INTRODUCTION

### *Male Reproductive System*

In the male reproductive system, the ultimate product for the continuation of the species is the healthy mature sperm cell. Sperm cell production begins with the proliferation and differentiation of spermatogonium, proceeds with the formation of spermatocytes and spermatids, and is completed by transforming spermatids into fertile mature spermatozoa (Kızılay and Baris, 2019). Spermatogenesis has three stages. The first phase is mitosis, in which spermatogonium is reproduced. Secondly, in meiosis, diploid spermatozoa decrease their chromosome number by halving and turning into haploid. Thirdly, in the spermiogenesis stage, spermatids' maturation and differentiation occur. Malfunctions in any of these stages lead to abnormal pathologies such as defective sperm cells or decreased sperm production (Suede et al., 2021). A specific period is required for the completed stages of spermatogenesis. Although this period changes according to the species, it takes approximately 74 days in humans (Neto et al., 2016). As the genetic heredity material is transmitted from generation to generation with sperm cells, healthy sperm production is crucial for the continuation of the species (Hao et al., 2019). Hormonal and autocrine/paracrine factors regulate sperm production and consist of a complex and gradual process in which diploid spermatogonium matures and differentiates to haploid sperm cells (Kızılay and Baris, 2019). Several types of testicular cells and hormonal factors produce mature sperm cells. These cells (Leydig, myoid, Sertoli, somatic, germ, etc.) and the substances produced from these structures constitute the micro testicular environment necessary for spermatogenesis. In order to produce a healthy normal sperm cell, the micro-testicular environment requires optimal conditions (Zhou et al., 2019).

### *Physio-Anatomical Structure*

Testicular germ cells (TGCs) are responsible for maintaining spermatogenesis throughout reproductive activity and originate from primordial germ cells located in the basement membrane of the seminiferous tubule. TGCs have oval nuclei close to the nuclear membrane, dense cytoplasm, a small Golgi apparatus, several mitochondria, and numerous ribosomes. Maintaining the genetic integrity, quality, and function of TGCs is essential for spermatogenetic activities. These cells can differentiate

through regeneration, differentiation, or apoptosis. The functions of the Sertoli cells (SCs) play an essential role in deciding which pathway these cells will follow. There is a very tight connection between TGCs and SCs. TGCs activities are likely regulated by paracrine factors released from SCs. In addition, other factors produced by Leydig cells (LCs) and Peritubular myoid cells (PMCs) also play a role in this regulation (Goossens et al., 2006). The spermatogonium produced from TGCs eventually differentiates to mature sperm cells. Spermatogonium are diploid precursors of all other testicular germ cells. Certain local substances also influence the decision of whether these cells either differentiate, regenerate or become apoptotic. For example, glial-derived neurotrophic factor stimulates spermatogonium regeneration, while stem cell factor and retinoic acid stimulate differentiation (Neto et al., 2016).

SCs are another cell group involved in sperm production. SCs create the structural framework and physiological environment necessary for spermatogenesis. These cells are polarised, irregularly formed columnar epithelial cells located in the basement membrane of the seminiferous tubule. Their basal surface is enriched in organelles, while their apical surface is associated with germ cells (Kızılay and Baris, 2019). Approximately 17-20% of the seminiferous tubule epithelium has SCs (Neto et al., 2016). SCs extend from the basement membrane of the seminiferous tubule towards the lumen and provide nutrient support to the seminiferous tubule epithelium, blood testicular barrier (BTB), and TGCs. They are also involved in the phagocytosis of degenerating germ cells. Hormones such as follicle-stimulating hormone (FSH) and testosterone and local factors produced by testicular cells such as myoid and germ regulate the activities of SSCs (Jégou, 1992). For example, testosterone and dihydrotestosterone regulate SCs through androgen receptors. SCs is also a target of FSH. In addition, testosterone activates the androgen receptor in SCs and induces functional pathways necessary for spermatogenesis (Kızılay and Baris, 2019). PMCs are smooth muscle-like cells responsible for contractile activity and propel immature spermatozoa towards the rete testis, the reticular portion of the seminiferous tubules. PMCs have characteristics of both smooth muscles and fibroblasts. In addition to contractility, these cells are involved in testicular development and spermatogenetic

activities. In particular, there is a close collaboration between PMCs and SCs (Díez-Torre et al., 2011).

LCs are polygonal formed testicular cells found in clusters between the seminiferous tubules and blood vessels in the intercellular area. They are believed to be formed by the differentiation of fibroblast-like cells or mesenchymal cells in the testicular intercellular area. LCs is mainly responsible for producing testosterone, small amounts of estrogen, and autocrine/paracrine substances. Luteinizing hormone (LH) binds to its receptor in LCs and causes stimulation of certain enzymes (Star protein, Cytochrome p450) involved in steroidogenesis. This stimulation stimulates an increase in the production of testosterone and estrogen and decreases LCs apoptosis by stimulation of specific signaling pathways. Testosterone regulates the reproductive axis by negative feedback and LCs function by short negative (ultra-fast negative) feedback. Neurotransmitters such as melatonin, epidermal growth factor, atrial natriuretic peptide, ghrelin, and gamma-aminobutyric acid also affect the function of LCs (Neto et al., 2016).

BTB functions as an anatomical and functional barrier that limits the paracellular passage of substances. Certain anatomical junctions close to the basal part between neighboring SCs constitute the BTB. Due to their metabolic needs and immunogenic properties, SCs need a stable microenvironment. BTB separates seminiferous tubule epithelium into two different areas. Thus, two different compartments, basal and adluminal, are formed. Thus, cells in the adluminal compartment are isolated from the external environment. The BTB consists of anatomical structures such as tight junctions, specific basal ectoplasmic extensions, gap junctions, and mammal desmosomes. PMCs and endothelial cells contribute secondarily to this barrier. Local substances such as cytokines and growth factors affect this barrier's structural integrity and function (Neto et al., 2016).

### **Hormonal Regulation**

FSH, LH, and testosterone are responsible for the hormonal stimulation of spermatogenesis (De Krester et al., 1998; Corradi et al., 2016). However, others, such as estrogen and growth hormone, also play a role in spermatogenesis (Tatem et al., 2019). Autocrine/paracrine stimuli such as cytokines and growth factors also play an additional role in the non-hormonal regulation of spermatogenesis

(Huleihel and Lunenfeld, 2004). The primary organ of the male reproductive system is the testes in the scrotum. The primary function of the testes is the production of male gametes, with additional functions such as testosterone production. The production of male gametes originates from testicular germ cells, while testosterone is produced by the LCs surrounding the seminiferous tubules. Sperm cells are produced in the seminiferous tubules and then transported to the epididymis, where they are stored (Suede et al., 2021). The process of spermatogenesis is regulated by signals produced by SCs and LCs. In addition to these cells, other testicular cells, such as peritubular cells, macrophages, and vascular tissues, also contribute to spermatogenesis (Konrad et al., 1998). A normal sperm cell is morphologically composed of a head, neck, midpiece, and tail, and the plasma membrane surrounds the sperm cell from head to tail (Bulduk and Cengiz, 2015). Only 300-500 of the 200-300 million sperm passing to the female genital tract can reach the site of fertilization.

Therefore, sperm morphology should not be abnormal for fertilization (Zaneveld et al., 1991; Bulduk and Cengiz, 2015). FSH helps the differentiation of spermatids to sperm cells by stimulating SCs. Although LH is the dominant hormone in sperm production, FSH is required for stimulation and ongoing spermatogenesis. FSH realizes its main effect together with testosterone. FSH indirectly stimulates DNA synthesis in spermatogonium and preleptotene spermatocytes and contributes to the meiosis stage of spermatogenesis (Kızılay and Baris, 2019). LH stimulates receptors in LCs, and testosterone secretion is realized. Certain gene expressions involved in the testis' steroidogenic and spermatogenetic activities are decreased without LH. At the same time, testosterone replacement can significantly ameliorate the effects of LH deficiency (Griffin et al., 2010). Testosterone is an essential hormone in the proliferation and differentiation of testicular germinal cells, the first step in spermatogenesis. The foremost testosterone-dependent step in spermatogenesis is the spermiogenesis stage, known as the post-meiotic stage, during which long spermatids differentiate. Furthermore, testosterone is highly effective in the survival of spermatocytes and spermatids as it strongly stimulates anti-apoptotic mechanisms (Kızılay and Baris, 2019). Moreover, the estrogen, growth hormone, and thyroid hormones, involved in testicular metabolic activities, also

play a role in spermatogenesis (Wagner et al., 2008).

### **Melatonin Synthesis and Pineal Gland**

Melatonin is synthesised mainly by pinealocytes, the primary cells of the pineal gland. Melatonin is also produced in small amounts by non-pinealocyte cells such as skin, lens, ciliary body, intestines, testis, ovary, uterus, placenta, oocytes, bone marrow, erythrocytes, platelets, lymphocytes, astrocytes, glial cells, mast cells, and neurons (Tan et al., 2018). In pinealocytes, melatonin is synthesized by a series of consecutive chemical reactions such as hydroxylation, decarboxylation, N-acetylation, and O-methylation of the amino acid tryptophan (Reiter, 1991). Melatonin synthesis is initiated by light information received from the retina. The received light information primarily reaches the suprachiasmatic nucleus (SCN) via the retinohypothalamic pathway, while the postganglionic sympathetic fibers of the superior cervical ganglion terminate in pinealocytes. Norepinephrine released from the nerve terminals of the superior cervical ganglia stimulates pineal cells via  $\beta$ -adrenergic receptors in pinealocytes and accelerates the synthesis of cyclic adenosine monophosphate (cAMP). Thus, tryptophan amino acid is hydroxylated to 5-tryptophan and converted to serotonin. Serotonin is acetylated by N-acetyltransferase (NAT) enzyme and converted into N-acetylserotonin. This stage represents the rate-limiting step of melatonin synthesis. Finally, O-methyltransferase produces melatonin from N-acetylserotonin (Dragojevic et al., 2015). The pineal gland is a small extension of the brain and adheres to the posterior wall of the third ventricle between the posterior and dorsal habenular junction. Although its size and position vary among species, the ratio of the gland to body weight is small in humans compared to other species. In adult humans, this gland weighs 100-180 mg, is 5-9 mm long, 3-6 mm wide, 3-5 mm deep, and is a cone-like gland covered by a pia mater. Embryologically, it originates from the posterior part of the third ventricle and is connected to this area by the pineal body. also, the third ventricle passes into the pineal body to form the epiphyseal pit. Although the pineal gland is small, it is the second organ with the highest blood flow (4 mL/min/g) after the kidneys. Arterial blood circulation is via the medial posterior choroidal branches of the posterior cerebral artery, while venous circulation is via the internal cerebral veins. Although the capillary

structure contains a differentiated endothelial structure, it does not contain the blood-brain barrier. In addition, the pineal gland has sympathetic innervation from the superior cervical ganglion. Pinealocytes have nuclei with irregular margins in light microscopy. The gland is also adjacent to numerous synaptic structures involved in axodendritic synaptic communication. After synthesizing melatonin, it is released into the blood or cerebrospinal circulation without storage. Interstitial cells, perivascular macrophages, pineal neurons, and neuron-like cells with paracrine function around pinealocytes contribute to melatonin synthesis (Atasoy and Erbas, 2017). Due to its water and lipid solubility, melatonin easily diffuses into cellular compartments. Once released into circulation, it can easily affect tissues through several fluids such as saliva, urine, cerebrospinal fluid, milk, and semen. Since melatonin is not stored in the pineal gland, plasma melatonin levels accurately represent the activity of the pineal gland. Melatonin secretion peaks at night and is low during the day. In humans, melatonin production reaches its highest levels at 3-6 years of age, while nocturnal melatonin levels decrease to 80% in adulthood. Although plasma melatonin levels vary in humans, some humans have minimal or no nocturnal melatonin secretion (Claustrat and Leston, 2015). Melatonin secretion is circadian, and nightfall is required for maximum secretion. Therefore, melatonin is also defined as the chemical expression of darkness or dark hormone. Light information is processed in retinal ganglion cells and delivered to the SCN via the retinohypothalamic pathway, which is embedded in the optic nerve. The SCN functions as a relay center sending information to the pineal gland. The neural information received through the central and peripheral nervous system is transmitted to the pinealocyte cells via the SCN, and a neural input controls the output of the pineal gland. If this neural input is removed, the pineal gland is inactive. The control of the pineal gland by a neural input from the SCN is not observed in other classical endocrine organs. In addition, negative feedback from peripheral signals may slightly alter melatonin release and rhythm (Reiter, 1991).

Melatonin modulates the target tissue via melatonin receptors, intracellular proteins such as calmodulin or calreticulin, orphan nuclear receptors, or antioxidant systems. Melatonin can bind to different types of melatonin receptors such as melatonin receptor type



1a (Mt1), melatonin receptor type 1b (Mt2), melatonin receptor type 1c, quinone reductase 2 enzyme (Mt3), retinoid-related orphan nuclear hormone receptor (RZR/RORa) and X-linked melatonin-related orphan receptor (GPR50). Mt1 and Mt2 are located on the cell membrane; Mt3 detoxification enzyme; melatonin receptor type 1c in fish, amphibians, and birds; RZR/RORa (retinoid-related orphan nuclear factor) transcription factor; GPR50 (X-linked melatonin-related orphan receptor) acts as an auxiliary of Mt1 (84). Although the interest of melatonin in its receptors is not similar, it shows a strong affinity to Mt1 and Mt2 and a weaker interest in Mt3 (Ng et al., 2017).

### **Melatonin in Male Reproductive System**

Due to its hydrophilic and lyophilic properties, melatonin can diffuse through barriers such as BTB and enter all testicular cells (Yu et al., 2018). Melatonin receptors exist in all testicular cells, especially LCs and SCs. In addition, melatonin has activity on releasing reproductive hormones such as Gonadotropin-releasing hormone (GnRH), FSH, and LH through receptor-mediated mechanisms (Sun et al., 2020). Melatonin regulates the release of gonadotropins by inhibiting voltage-sensitive calcium channels and cAMP accumulation in rat gonadotroph cells (Vanecek, 1999). Melatonin shows a better affinity for LCs than other testicular cells (Baburski et al., 2015). Firstly, the idea that the pineal gland could control puberty was put forward due to early puberty in a child patient with a pineal gland tumor. In the following years, it was stated that melatonin had an inhibitory effect on the reproductive system, but this inhibition ceased with puberty (Reiter, 1998). In recent years, there has also been a significant increase in the number of women who delay childbirth until their late thirties, and melatonin supplements have been used to postpone birth (Meredith et al., 2000). The effect of melatonin on the reproductive system is different according to species and seasons (Yu et al., 2018). Many female mammalian species exhibit annual cycles of fecundity and sterility to provide for the survival of their offspring, planning the optimal time of birth. The essential mechanism mediating this is variation in day length or the photoperiod itself. Mammals with seasonal reproductive cycles are divided into short-day and long-day reproductive species. Sheep, Syrian hamsters, and mink are animals with seasonal reproductive cycles. Neural and endocrine

mechanisms underlying seasonal reproduction are investigated by modeling short and long days in laboratory conditions (Tamarkin et al., 1985). According to species, changes in day length and melatonin concentrations affect the male reproductive system. Melatonin decreases androgen receptor and androgen binding protein expression levels in rodents, while it decreases testosterone and androgen levels in Syrian hamsters and reduces testicular size. In addition, melatonin increases testicular development in Sikaa deer, sperm production in silver foxes, and testosterone levels in goats. In sheep, melatonin supplementation of LCs and SCs cultures increases factors such as testosterone, stem cell, and insulin growth, decreasing estrogen levels through Mt1 (Yu et al., 2018). In humans, melatonin inhibits the reproductive axis before puberty, but this inhibitory effect disappears as increasing body mass with puberty decreases plasma melatonin concentration below the critical level (Cebrián-Pérez et al., 2014). In certain male hamsters with seasonal reproduction, during long nights (increased melatonin secretion), disturbances in reproductive function and degeneration of the testes may occur (Yong et al., 2021). In female rats, melatonin treatment inhibited ovarian development and delayed the onset of puberty; in male rats, melatonin treatment decreased testicular size (Kennaway et al., 1997; Edmonds and Stetson, 1994; Edmonds and Stetson, 1995). Serum and seminal fluid melatonin levels have been reported to be found at low levels in infertile men (Frungeri et al., 2017). The melatonin receptors function in humans' hypothalamus and pituitary gland (Weaver et al., 1993; Johnston et al., 2006). Moreover, melatonin plays a role in testicular development through melatonin receptors in the testes (García et al., 2003; Izzo et al., 2010). Melatonin supplementation reduces FSH secretion from SCs in male rats (Lang et al., 1984). In an in vitro study of the fetal rat pituitary gland, it was reported to inhibit LH release (Martin et al., 1982). Hypothalamic neurons in the suprachiasmatic nuclei (SCN) and GnRH releasing neurons are the main targets of melatonin (Wierman et al., 1995). It has been reported that testicular weight decreased by 60% in mice injected with melatonin implants into the GnRH neuronal system in the hypothalamus (Glass et al., 1987). Long-term melatonin use in male mice has been reported to cause decreases in testicular and seminal vesicle volumes and sperm count (Forger et al., 1985).

Melatonin is crucial in photo periodically breeding animals. For example, decreases in gonadotropin inhibitory hormone (GnIH) secretion are found in quails undergoing pinealectomy and orbital enucleation. This decreased GnIH can be restored by exogenous melatonin treatment in a dose-dependent manner (Ubuka et al., 2005). Melatonin is known to regulate GnIH expression in photoperiodic mammals. For example, Siberian hamsters produce more GnIH short days than long days (Ubuka et al., 2012). In rats, melatonin receptor expression is altered after pinealectomy. Production of reproductive hormones in male rats losses its seasonal rhythm after pinealectomy. In addition, pinealectomy changed the melatonin receptor expression type from MT1 to MT2 in the hypothalamus (Liu et al., 2013). Testicular morphological abnormalities and gonadal reduction are observed in male hamsters during long nights (Mason et al., 2010). In addition, melatonin treatment induced significant decreases in the endoplasmic reticulum mass of mouse LCs (Redins et al., 2002). Testosterone production has a complicated release mechanism and is regulated by many factors. However, testosterone production mainly depends on cAMP signaling stimulated by LH (Stojilković et al., 1989). It has been reported that melatonin administration to rat LCs in vitro studies decreases cAMP production dose-dependently (Wu et al., 2001). Moreover, it has been reported that melatonin could also affect testosterone production through cAMP-independent pathways (Stojilković et al., 1989). Since LCs are a higher affinity to melatonin, melatonin plays an essential role in the functions of the male reproductive system (Baburski et al., 2015; Li and Zhou, 2015). Melatonin regulates androgen secretion via the melatonin receptor in LCs (Valenti et al., 1999). It has been reported that 10 mg/kg exogenous melatonin administration for 14 days in mice resulted in the malfunction of seminiferous tubules (Mehraein and Negahdar, 2011). A study in melatonin-treated rats found testicular size reduction and decreased spermatid counts (Rashed et al., 2010). However, despite all these side effects, melatonin has beneficial properties on testicular tissue. Antioxidant substances protect the testes from environmental damage, side effects of cancer, and other toxic molecules (Pieri et al., 1994). Melatonin is a powerful antioxidant (Yang et al., 2014). In a rat study, melatonin significantly ameliorated testicular torsion-induced oxidative stress and lipid peroxidation (Parlaktas

et al., 2014). In addition, melatonin treatment decreased the severity of seminiferous tubule damage and increased antioxidant enzyme levels in rats with varicocele (Semercioz et al., 2003). Moreover, melatonin increases the response of SCs to FSH; in this case, testicular damage can be prevented (Heindel et al., 1984). Using melatonin against testicular toxicity in conditions such as testicular torsion or certain anticancer drugs helps protect testicular activities (Lee et al., 2012; Chabra et al., 2013). It has also been reported that melatonin has an antioxidant effect in cases where toxic substances such as cadmium, fluoride, or ochratoxin A increase testicular oxidative stress (Ji et al., 2012; Malekinejad et al., 2011). Moreover, melatonin reduces oxidative damage induced by electromagnetic radiation (Oksay et al., 2012). Testicular tissue is saturated with lipids, and melatonin has been reported to reduce lipid peroxidation (Agil et al., 2011). Melatonin positively affected testicular damage in mice fed a high-fat diet (Zhang et al., 2012). Melatonin protects against sperm cell damage (Awad et al., 2006). For instance, decreased melatonin levels result in abnormal sperm increase (Yie et al., 1999). It has been reported that sperm quality decreases in rams out of the breeding season (Azawi et al., 2012), and melatonin improves semen quality in rams and goats out of the breeding season (Ramadan et al., 2009). However, in a study on men, it was reported that melatonin administration mostly did not cause any change in semen quality. However, in a few males, it caused a decrease in semen quality (Luboshitzky et al., 2002). It has been reported that melatonin administration against testicular ischemia-reperfusion reduces sperm abnormality in rats (Koksal et al., 2012). In invitro studies, it has been reported that melatonin increases mitochondrial activity in sperm cells and increases the percentage of progressive sperm (Du Plessis et al., 2010). It has been stated that this influence of melatonin on sperm quality in vitro conditions is due to the antioxidant effect (Ashrafi et al., 2011). It also shows activity in the male reproductive system through melatonin receptors. (Espino et al., 2011; Reiter et al., 2013).

#### ***Stress-Induced Infertility and Melatonin Treatment***

Stress is defined as a real or perceived threat to the homeostasis or well-being of an organism resulting from internal or external adverse events (or stressors). Sperm parameters decrease in those exposed to psychological

stress, such as medical students, people who have witnessed the war, men exposed to work stress, and people who have lost a loved one (Nargund, 2015). Although fertility is gradually decreasing in modern societies, many health plans are being made to increase the decreasing population in industrialized countries. More than 186 million people worldwide, mostly in developed countries, have infertility. In the last 40 years, 50-60% decreases in sperm count and quality have been observed. Stress-causing factors such as social failures, economic difficulties, disappointments, and prolonged sitting hours are among the etiological causes of male infertility (Ilacqua et al., 2018). Many clinical studies examining the effects of psychological stress on male fertility have shown that stress is associated with abnormal semen parameters. (Nargund, 2015). In recent years, epidemiological studies have shown that semen parameters decrease in men with high-stress levels (Nordkap et al., 2016; Durairajanayagam, 2018).

Similarly, it is known that there are decreases in sperm concentration and number in depressed male patients (Zou et al., 2018; Zou et al., 2019). In addition, when exposed to stress created by physical stimuli in animals, deterioration in spermatological activities occurs (Guo et al., 2017; Lin et al., 2020). Sperm are overly mobile and provide energy from the abundant mitochondria they have, which causes excessive production of free radicals in the sperm cell. In addition, the fact that the sperm cell is rich in polyunsaturated fatty acids causes it to be sensitive to lipid peroxidation. These two conditions make the sperm cell susceptible to oxidative damage (Lenzi et al., 1996; Darbandi et al., 2018). Studies it has been reported that chronic stress causes oxidative damage and causes disruption in spermatogenetic activities (Liu et al., 2019). In addition, it is mentioned that there is a close relationship between testicular paracrine/autocrine factors such as inflammatory cytokines and spermatogenetic activities (Guazzone et al., 2009). It has been reported that testicular apoptosis increases and testosterone levels decrease in rats' cold water-induced stress model (Juárez-Rojas et al., 2015). In addition, it was reported that the number of testicular apoptotic cells increased in rats administered exogenous dexamethasone (Yazawa et al., 2000).

Although melatonin is safely administered in different doses and times, studies on humans have followed the use of melatonin in stress situations (Guo et al., 2017; Lin et al., 2021; Zhang et al., 2021). For example, it is

known that melatonin exhibits anti-inflammatory anti-apoptotic activity in hippocampal inflammation induced by chronic stress (Zhang et al., 2022). It is stated that melatonin shows anti-inflammatory and antioxidant activity in colon inflammation and oxidative stress caused by chronic restraint stress (Lin et al., 2021). Moreover, it has been reported that melatonin treatment showed therapeutic efficacy against disruptions in the intestinal mucosa in mice subjected to chronic restraint stress (Lin et al., 2020). It has been reported that melatonin treatment increases antioxidant activity in the heart in mice under restraint stress (Muqbil et al., 2020). It has been reported that the use of melatonin on metastasis caused by chronic restraint stress in ovarian cancer has a protective effect on ovarian cancer (Bu et al., 2020). It has been reported that using melatonin on gastric lesions induced by stress has a protective effect by eliminating hydroxyl radicals (Bandyopadhyay et al., 2000). In stressful situations, exogenous melatonin acts as an antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, etc., on the male reproductive system. (Kanter, 2010; Asghari et al., 2016; Guo et al., 2017; Sekmenli et al., 2017). Melatonin shows antioxidant and anti-apoptotic effects in heat-induced sperm damage in humans (Zhao et al., 2021). It has been reported that the use of melatonin in temperature-induced testicular damage in wild boars affects the regulation of glucose metabolism in SCs (Deng et al., 2022). Moreover, it has been reported that long-term use of melatonin after heat stress has a healing effect on heat-induced DNA damage and apoptosis and has positive effects on testicular tissue (Guo et al., 2021). In a study in mice, the use of melatonin (10 mg/kg/day) in the damage caused by restraint stress showed an antibiotic, antioxidant, and anti-inflammatory effect, resulting in an increase in testicular tissue protection and spermatological parameters.

## CONCLUSION

Melatonin is known to be beneficial in the treatment of male-induced infertility. The literature studies show that using melatonin in male reproductive system pathologies is beneficial in terms of reproductive health. On the other hand, stressful situations appear as an inevitable element of modern life. Physiopathology can be formed in many physiological systems, including the male reproductive system, especially in prolonged exposure to stress. Stress appears to cause infertility in men by causing decreases

in sperm parameters. Although it is known that many substances are effective in the treatment of infertility in men, the substance to be used should be safe and have few side effects. In this sense, melatonin can be considered as a safe molecule. Although the positive effects of exogenous melatonin on the male reproductive system parameters due to stress have been shown in the literature studies through antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms, extensive research is still needed.

## REFERENCES

- Agil, A., Navarro-Alarcón, M., Ruiz, R., Abuhamadah, S., El-Mir, M. Y. & Vázquez, G. F. (2011). Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Pineal Research*, 50 (2), 207–212.
- Andersen, L. P., Gögenur, I., Rosenberg, J. & Reiter, R. J. (2016). The safety of melatonin in humans. *Clinical Drug Investigation*, 36 (3), 169-175.
- Asghari, A., Akbari, G., Meghdadi, A. & Mortazavi, P. (2016). Effects of melatonin and metformin co-administration on testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Urology*, 12 (6), 410.e1–410.e7.
- Ashrafi, I., Kohram, H., Najjian, H., Bahreini, M. & Poorhamdollah M. (2011). Protective effect of melatonin on sperm motility parameters on liquid storage of ram semen at 5 °C. *African Journal of Biotechnology*, 10 (34), 6670–6674.
- Atasoy, Ö. B. & Erbaş, O. (2017). Physiological effects of melatonin hormone. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Journal of Medicine*, 3 (1), 52-62.
- Awad, H., Halawa, F., Mostafa, T. & Atta, H. (2006). Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology*, 29 (3), 409–413.
- Azawi, O. I., Al-Khashab, A. N. T. M. & Al-Kadoo, N. N. (2012). Effect of gonadotropin-releasing hormone treatment on semen characteristics and enzymatic activities of Awassi rams in breeding and non-breeding seasons. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 2 (1), 13–19.
- Baburski, A. Z., Sokanovic, S. J., Janjic, M. M., Stojkov-Mimic, N. J., Bjelic, M. M., Andric, S. A. & Kostic, T. S. (2015). Melatonin replacement restores the circadian behavior in adult rat Leydig cells after pinealectomy. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 413, 26–35.
- Bandyopadhyay, D., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., Reiter, R. J. & Banerjee, R. K. (2000). melatonin protects against stress-induced gastric lesions by scavenging the hydroxyl radical. *Journal of Pineal Research*, 29 (3), 143–151.
- Bu, S., Wang, Q., Sun, J., Li, X., Gu, T. & Lai, D. (2020). Melatonin suppresses chronic restraint stress-mediated metastasis of epithelial ovarian cancer via NE/AKT/ $\beta$ -catenin/SLUG axis. *Cell Death & Disease*, 11 (8), 644.
- Bulduk, O. & Cengiz, N. (2015). Morphological overview of infertility: Sperm head defects and fertilization. *Medical Journal of Muğla Sıtkı Koçman University*, 2 (2), 78-87.
- Cebrián-Pérez, J. A., Casao, A., González-Arto, M., dos Santos Hamilton, T. R., Pérez-Pé, R. & Muiño-Blanco, T. (2014). Melatonin in sperm biology: breaking paradigms. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 49 (4), 11–21.
- Chabra, A., Shokrzadeh, M., Naghshvar, F., Salehi, F. & Ahmadi, A. (2014). Melatonin ameliorates oxidative stress and reproductive toxicity induced by cyclophosphamide in male mice. *Human & Experimental Toxicology*, 33 (2), 185–195.
- Claustrat, B. & Leston, J. (2015). Melatonin: Physiological effects in humans. *Neuro-chirurgie*, 61 (2-3), 77–84.
- Corradi, P. F., Corradi, R. B. & Greene, L. W. (2016). Physiology of the hypothalamic-pituitary gonadal axis in the male. *The Urologic Clinics of North America*, 43 (2), 151–162.
- Darbandi, M., Darbandi, S., Agarwal, A., Sengupta, P., Durairajanayagam, D., Henkel, R. & Sadeghi, M. R. (2018). Reactive oxygen species and male reproductive hormones. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 16 (1), 87.
- De Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. & Wreford, N. (1998). Spermatogenesis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 13 (1), 1–8.
- Deng, C. C., Zhang, J. P., Huo, Y. N., Xue, H. Y., Wang, W., Zhang, J. J. & Wang, X. Z. (2022). Melatonin alleviates the heat stress-induced impairment



- of Sertoli cells by reprogramming glucose metabolism. *Journal of Pineal Research*, 73 (3), e12819.
- Díez-Torre, A., Silván, U., Moreno, P., Gumucio, J. & Aréchaga, J. (2011). Peritubular myoid cell-derived factors and their potential role in the progression of testicular germ cell tumors. *International Journal of Andrology*, 34 (4-2), 252–265.
- Dragojevic Dikic, S., Jovanovic, A. M., Dikic, S., Jovanovic, T., Jurisic, A. & Dobrosavljevic, A. (2015). Melatonin: a “Higgs boson” in human reproduction. *Gynecological endocrinology: The official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 31 (2), 92–101.
- Du Plessis, S. S., Hagenaar, K. & Lampiao, F. (2010). The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. *Andrologia*, 42 (2), 112–116.
- Durairajanayagam D. (2018). Lifestyle causes of male infertility. *Arab Journal of Urology*, 16 (1), 10–20.
- Edmonds, K. E. & Stetson, M. H. (1994). Photoperiod and melatonin affect testicular growth in the marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *Journal of Pineal Research*, 17 (2), 86–93.
- Edmonds, K. E. & Stetson, M. H. (1995). The pineal gland and melatonin affect testicular status in the adult marsh rice rat (*Oryzomys palustris*). *General and Comparative Endocrinology*, 99 (3), 265–274.
- Espino, J., Ortiz, Á., Bejarano, I., Lozano, G. M., Monllor, F., García, J. F., Rodríguez, A. B. & Pariente, J. A. (2011). Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinase-mediated pathways. *Fertility and Sterility*, 95 (7), 2290–2296.
- Forger, N. G. & Zucker, I. (1985). Photoperiodic regulation of reproductive development in male white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) born at different phases of the breeding season. *Journal of Reproduction and Fertility*, 73 (1), 271–278.
- Frungieri, M. B., Calandra, R. S. & Rossi, S. P. (2017). Local Actions of Melatonin in Somatic Cells of the Testis. *International Journal of Molecular Sciences*, 18 (6), 1170.
- García, A., Landete-Castillejos, T., Zarazaga, L., Garde, J. & Gallego, L. (2003). Seasonal changes in melatonin concentrations in female Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Journal of Pineal Research*, 34 (3), 161–166.
- Glass, J. D. & Knotts, L. K. (1987). A brain site for the anti gonadal action of melatonin in the white-footed mouse (*Peromyscus leucopus*): involvement of the immunoreactive GnRH neuronal system. *Neuroendocrinology*, 46 (1), 48–55.
- Goossens, E. & Tournaye, H. (2006). Testicular stem cells. *Seminars in Reproductive Medicine*, 24 (5), 370–378.
- Griffin, D. K., Ellis, P. J., Dunmore, B., Bauer, J., Abel, M. H. & Affara, N. A. (2010). Transcriptional profiling of luteinizing hormone receptor-deficient mice before and after testosterone treatment provides insight into the hormonal control of postnatal testicular development and Leydig cell differentiation. *Biology of Reproduction*, 82 (6), 1139–1150.
- Guazzone, V. A., Jacobo, P., Theas, M. S. & Lustig, L. (2009). Cytokines and chemokines in testicular inflammation: A brief review. *Microscopy Research and Technique*, 72 (8), 620–628.
- Guo, Y., Chen, H., Wang, Q. J., Qi, X., Li, Q., Fu, W., Huang, J., Yao, C. Y., Liu, Z. Y., Wang, M. Z., An, L., Tian, J. H. & Wu, Z. H. (2021). Prolonged melatonin treatment promotes testicular recovery by enhancing RAC1-mediated apoptotic cell clearance and cell junction-dependent spermatogenesis after heat stress. *Theriogenology*, 162, 22–31.
- Guo, Y., Sun, J., Li, T., Zhang, Q., Bu, S., Wang, Q. & Lai, D. (2017). Melatonin ameliorates restraint stress-induced oxidative stress and apoptosis in testicular cells via NF-κB/iNOS and Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Scientific Reports*, 7 (1), 9599.
- Hao, S. L., Ni, F. D. & Yang, W. X. (2019). The dynamics and regulation of chromatin remodeling during spermiogenesis. *Gene*, 706, 201–210.
- Heindel, J. J., Jackson, F. L. & Berkowitz, A. S. (1984). Role of the pineal in the alteration of hamster Sertoli cell responsiveness to FSH during testicular regression. *Journal of Andrology*, 5 (3),



- 211–215.
- Huleihel, M. & Lunenfeld, E. (2004). Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. *Asian Journal of Andrology*, 6 (3), 259–268.
- Ilacqua, A., Izzo, G., Emerenziani, G. P., Baldari, C. & Aversa, A. (2018). Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 16 (1), 115.
- Izzo, G., Francesco, A., Ferrara, D., Campitiello, M. R., Serino, I., Minucci, S. & d'Istria, M. (2010). Expression of melatonin (MT1, MT2) and melatonin-related receptors in the adult rat testes and during development. *Zygote (Cambridge, England)*, 18 (3), 257–264.
- Jégou B. (1992). The Sertoli cell in vivo and in vitro. *Cell Biology and Toxicology*, 8 (3), 49–54.
- Ji, Y. L., Wang, H., Meng, C., Zhao, X. F., Zhang, C., Zhang, Y., Zhao, M., Chen, Y. H., Meng, X. H. & Xu, D. X. (2012). Melatonin alleviates cadmium-induced cellular stress and germ cell apoptosis in testes. *Journal of Pineal Research*, 52 (1), 71–79.
- Johnston, J. D., Klosen, P., Barrett, P. & Hazlerigg, D. G. (2006). Regulation of MT melatonin receptor expression in the fetal rat pituitary. *Journal of Neuroendocrinology*, 18 (1), 50–56.
- Juárez-Rojas, A. L., García-Lorenzana, M., Aragón-Martínez, A., Gómez-Quiroz, L. E. & Retana-Márquez, M. (2015). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61 (4), 211–221.
- Kanter M. (2010). Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Experimental and Molecular Pathology*, 89 (3), 314–320.
- Kennaway, D. J. & Rowe, S. A. (1997). Controlled-release melatonin implants delay puberty in rats without altering melatonin rhythmicity. *Journal of Pineal Research*, 22 (3), 107–116.
- Kızılay, F. & Altay, B. (2019). Spermatogenesis, spermiogenesis, and clinical reflections. *Andrology Bulletin*, 21 (4), 177-184.
- Koksal, M., Oğuz, E., Baba, F., Eren, M. A., Ciftci, H., Demir, M. E., Kurcer, Z., Take, G., Aral, F., Ocak, A. R., Aksoy, N. & Ulas, T. (2012). Effects of melatonin on testis histology, oxidative stress, and spermatogenesis after experimental testis ischemia-reperfusion in rats. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16 (5), 582–588.
- Konrad, L., Weber, M. A., Groos, S., Albrecht, M. & Aumüller, G. (1998). Paracrine interaction in testicular somatic cells. *Italian Journal of Anatomy and Embryology = Archivio Italiano di Anatomia ed Embriologia*, 103 (4-1), 139–152.
- Lang, U., Aubert, M. L., Rivest, R. W., Vinas-Bradtko, J. C. & Sizonenko, P. C. (1984). Daily afternoon administration of melatonin does not irreversibly inhibit sexual maturation in the male rat. *Endocrinology*, 115 (6), 2303–2310.
- Lee, K. M., Lee, I. C., Kim, S. H., Moon, C., Park, S. H., Shin, D. H., Kim, S. H., Park, S. C., Kim, H. C. & Kim, J. C. (2012). Melatonin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia*, 44 (1), 796–803.
- Lenzi, A., Picardo, M., Gandini, L. & Dondero, F. (1996). Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. *Human Reproduction Update*, 2 (3), 246–256.
- Li, C., & Zhou, X. (2015). Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 446, 175–180.
- Lin, R., Wang, Z., Cao, J., Gao, T., Dong, Y. & Chen, Y. (2021). Role of melatonin in murine “restraint stress”-induced dysfunction of colonic microbiota. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 59 (5), 500–512.
- Lin, R., Wang, Z., Cao, J., Gao, T., Dong, Y. & Chen, Y. (2020). Role of melatonin in intestinal mucosal injury induced by restraint stress in mice. *Pharmaceutical Biology*, 58 (1), 342–351.
- Liu, B., Zhao, L., Yue, C., Qian, M. & Xie, M. (2019). Changes in gonadal function at different stages of chronic restraint stress-induced depression animals. *Physiology & Behavior*, 210, 112656.
- Liu, X. Y., Xu, Y. T., Shi, Q., Lu, Q. S., Ma, S. R., Xu, X. Y. & Guo, X. Z. (2013). Alterations of

- reproductive hormones and receptors of male rats at the winter and summer solstices and the effects of pinealectomy. *Neuro Endocrinology Letters*, 34 (2), 143–153.
- Luboshitzky, R., Shen-Orr, Z., Nave, R., Lavi, S. & Lavie, P. (2002). Melatonin administration alters semen quality in healthy men. *Journal of Andrology*, 23 (4), 572–578.
- Malekinejad, H., Mirzakhani, N., Razi, M., Cheraghi, H., Alizadeh, A. & Dardmeh, F. (2011). Protective effects of melatonin and *Glycyrrhiza glabra* extract on ochratoxin A-induced damages on testes in mature rats. *Human & Experimental Toxicology*, 30 (2), 110–123.
- Martin, J. E. & Sattler, C. (1982). Selectivity of melatonin pituitary inhibition for luteinizing hormone-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, 34 (2), 112–116.
- Mason, A. O., Duffy, S., Zhao, S., Ubuka, T., Bentley, G. E., Tsutsui, K., Silver, R. & Kriegsfeld, L. J. (2010). Photoperiod and reproductive condition are associated with changes in RFamide-related peptide (RFRP) expression in Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Biological Rhythms*, 25 (3), 176–185.
- Mehraein, F. & Negahdar, F. (2011). Morphometric evaluation of seminiferous tubules in aged mice testes after melatonin administration. *Cell Journal*, 13 (1), 1–4.
- Meredith, S., Jackson, K., Dudenhoefter, G., Graham, L., & Epple, J. (2000). Long-term supplementation with melatonin delays reproductive senescence in rats, without an effect on number of primordial follicles. *Experimental gerontology*, 35(3), 343–352.
- Muqbil, I., Fatima, S., Azmi, A. S., Alsharidah, A. S., Khan, S. A., Aljaser, F. & Banu, N. (2020). Restraint stress abates the antioxidant potential of melatonin on dimethyl benz (a) anthracene (DMBA) induced carcinogenesis. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 37 (10), 96.
- Nargund V. H. (2015). Effects of psychological stress on male fertility. *Nature Reviews Urology*, 12 (7), 373–382.
- Neto, F. T., Bach, P. V., Najari, B. B., Li, P. S. & Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 59, 10–26.
- Ng, K. Y., Leong, M. K., Liang, H. & Paxinos, G. (2017). Melatonin receptors: distribution in the mammalian brain and their respective putative functions. *Brain Structure & Function*, 222 (7), 2921–2939.
- Nordkap, L., Jensen, T. K., Hansen, Å. M., Lassen, T. H., Bang, A. K., Joensen, U. N., Blomberg Jensen, M., Skakkebaek, N. E. & Jørgensen, N. (2016). Psychological stress and testicular function: a cross-sectional study of 1,215 Danish men. *Fertility and Sterility*, 105 (1), 174–87.e872.
- Oksay, T., Naziroğlu, M., Doğan, S., Güzel, A., Gümral, N. & Koşar, P. A. (2014). Protective effects of melatonin against oxidative injury in rat testis induced by wireless (2.45 GHz) devices. *Andrologia*, 46 (1), 65–72.
- Parlaktas, B. S., Atilgan, D., Ozyurt, H., Gencten, Y., Akbas, A., Erdemir, F. & Uluocak, N. (2014). The biochemical effects of ischemia-reperfusion injury in the ipsilateral and contralateral testes of rats and the protective role of melatonin. *Asian Journal of Andrology*, 16 (2), 314–318.
- Pieri, C., Marra, M., Moroni, F., Recchioni, R. & Marcheselli, F. (1994). Melatonin: a peroxy radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sciences*, 55 (15), 271–276.
- Ramadan, T. A., Taha, T. A., Samak, M. A. & Hassan, A. (2009). Effectiveness of exposure to long day followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goats during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*, 71 (3), 458–468.
- Rashed, R.A., Mohamed, I.K. & Ei-Alfy, S.H. (2010). Effects of two different doses of melatonin on the spermatogenic cells of rat testes: a light and electron microscopic study. *Egyptian Journal of Histology*, 33, 819–835.
- Redins, C. A., Redins, G. M. & Novaes, J. C. (2002). The effects of treatment with melatonin on the ultrastructure of mouse Leydig cells: a quantitative study. *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 62 (3), 517–523.
- Reiter, R. J., Rosales-Corral, S. A., Manchester, L. C. &

- Tan, D. X. (2013). Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (4), 7231–7272.
- Reiter R. J. (1998). Melatonin and human reproduction. *Annals of Medicine*, 30 (1), 103–108.
- Reiter R. J. (1991). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocrine Reviews*, 12 (2), 151–180.
- Sekmenli, T., Gunduz, M., Öztürk, B., Karabağlı, P., Ciftci, I., Tekin, G. & Yılmaz, M. (2017). The effects of melatonin and colchicine on ischemia-reperfusion injury in experimental rat testicular torsion model. *Journal of Pediatric Surgery*, 52 (4), 582–586.
- Semercioz, A., Onur, R., Ogras, S. & Orhan, I. (2003). Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinology Letters*, 24 (1-2), 86–90.
- Stojilković, S. S., Chang, J. P., Ngo, D., Tasaka, K., Izumi, S. & Catt, K. J. (1989). Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *Journal of Steroid Biochemistry*, 33 (4), 693–703.
- Suede, S.H., Malik, A. & Sapra, A. (2021). Histology Spermatogenesis. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing, 2021,1-6.
- Sun, T. C., Li, H. Y., Li, X. Y., Yu, K., Deng, S. L. & Tian, L. (2020). Protective effects of melatonin on male fertility preservation and reproductive system. *Cryobiology*, 95, 1–8.
- Tamarkin, L., Baird, C. J. & Almeida, O. F. (1985). Melatonin: a coordinating signal for mammalian reproduction? *Science (New York, N.Y.)*, 227 (4688), 714–720.
- Tan, D. X., Xu, B., Zhou, X. & Reiter, R. J. (2018). Pineal Calcification, Melatonin Production, Aging, Associated Health Consequences and Rejuvenation of the Pineal Gland. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 23 (2), 301.
- Tatem, A. J., Beilan, J., Kovac, J. R. & Lipshultz, L. I. (2020). Management of Anabolic Steroid-Induced Infertility: Novel Strategies for Fertility Maintenance and Recovery. *The world journal of Men's Health*, 38 (2), 141–150.
- Ubuka, T., Bentley, G. E., Ukena, K., Wingfield, J. C. & Tsutsui, K. (2005). Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (8), 3052–3057.
- Ubuka, T., Inoue, K., Fukuda, Y., Mizuno, T., Ukena, K., Kriegsfeld, L. J. & Tsutsui, K. (2012). Identification, expression, and physiological functions of Siberian hamster gonadotropin-inhibitory hormone. *Endocrinology*, 153 (1), 373–385.
- Valenti, S., Thellung, S., Florio, T., Giusti, M., Schettini, G. & Giordano, G. (1999). A novel mechanism for the melatonin inhibition of testosterone secretion by rat Leydig cells: reduction of GnRH-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>. *Journal of Molecular Endocrinology*, 23 (3), 299–306.
- Van Vuuren, R. J., Pitout, M. J., van Aswegen, C. H. & Theron, J. J. (1992). Putative melatonin receptor in human spermatozoa. *Clinical Biochemistry*, 25 (2), 125–127.
- Vanecek J. (1999). Inhibitory effect of melatonin on GnRH-induced LH release. *Reviews of Reproduction*, 4 (2), 67–72.
- Wagner, M. S., Wajner, S. M. & Maia, A. L. (2008). The role of thyroid hormone in testicular development and function. *The Journal of Endocrinology*, 199 (3), 351–365.
- Weaver, D. R., Stehle, J. H., Stopa, E. G. & Reppert, S. M. (1993). Melatonin receptors in human hypothalamus and pituitary: implications for circadian and reproductive responses to melatonin. *The Journal of clinical endocrinology and Metabolism*, 76 (2), 295–301.
- Wierman, M. E., Bruder, J. M. & Kepa, J. K. (1995). Regulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in hypothalamic neuronal cells. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 15 (1), 79–88.
- Wu, C. S., Leu, S. F., Yang, H. Y. & Huang, B. M. (2001). Melatonin inhibits the expression of steroidogenic acute regulatory protein and steroidogenesis in MA-10 cells. *Journal of Andrology*, 22 (2), 245–254.

- Yang, Y., Sun, Y., Yi, W., Li, Y., Fan, C., Xin, Z., Jiang, S., Di, S., Qu, Y., Reiter, R. J. & Yi, D. (2014). A review of melatonin as a suitable antioxidant against myocardial ischemia-reperfusion injury and clinical heart diseases. *Journal of Pineal Research*, 57 (4), 357–366.
- Yazawa, H., Sasagawa, I. & Nakada, T. (2000). apoptosis of testicular germ cells induced by exogenous glucocorticoid in rats. *Human Reproduction* (Oxford, England), 15 (9), 1917–1920.
- Yie, S. M., Daya, S., Brown, G. M., Deys, L. & YoungLai, E. V. (1991). Melatonin and aromatase stimulating activity of human seminal plasma. *Andrologia*, 23 (3), 227–231.
- Yong, W., Ma, H., Na, M., Gao, T., Zhang, Y., Hao, L., Yu, H., Yang, H. & Deng, X. (2021). Roles of melatonin in the field of reproductive medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 144, 112001.
- Yu, K., Deng, S. L., Sun, T. C., Li, Y. Y. & Liu, Y. X. (2018). Melatonin Regulates the Synthesis of Steroid Hormones on Male Reproduction: A Review. *Molecules* (Basel, Switzerland), 23 (2), 447.
- Zaneveld, L. J., De Jonge, C. J., Anderson, R. A. & Mack, S. R. (1991). Human sperm capacitation and the acrosome reaction. *Human Reproduction* (Oxford, England), 6 (9), 1265–1274.
- Zhang, H., Wei, M., Sun, N., Wang, H. & Fan, H. (2022). Melatonin attenuates chronic stress-induced hippocampal inflammatory response and apoptosis by inhibiting ADAM17/TNF- $\alpha$  axis. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 169, 113441.
- Zhang, K., Lv, Z., Jia, X. & Huang, D. (2012). Melatonin prevents testicular damage in hyperlipidaemic mice. *Andrologia*, 44 (4), 230–236.
- Zhao, F., Whiting, S., Lambourne, S., Aitken, R. J. & Sun, Y. P. (2021). Melatonin alleviates heat stress-induced oxidative stress and apoptosis in human spermatozoa. *Free Radical Biology & Medicine*, 164, 410–416.
- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q. & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76 (14), 2681–2695.
- Zou, P., Sun, L., Chen, Q., Zhang, G., Yang, W., Zeng, Y., Zhou, N., Li, Y., Liu, J., Ao, L., Cao, J. & Yang, H. (2019). Social support modifies an association between work stress and semen quality: Results from 384 Chinese male workers. *Journal of Psychosomatic Research*, 117, 65–70.
- Zou, P., Wang, X., Sun, L., Chen, Q., Yang, H., Zhou, N., Chen, H., Zhang, G., Ling, X., Wang, Z., Gao, J., Mo, M., Huang, L., Peng, K., Chen, S., Cui, Z., Liu, J., Ao, L. & Cao, J. (2018). Semen Quality in Chinese College Students: Associations With Depression and Physical Activity in a Cross-Sectional Study. *Psychosomatic Medicine*, 80 (6), 564–572.



# Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni

## Bulletin of Veterinary Pharmacology and Toxicology Association

e-ISSN: 2667-8381

Cansu BALIKÇI<sup>a</sup>  
Gamze GÖKÇAY<sup>b</sup>  
Songül ERDOĞAN<sup>c</sup>  
Hasan ERDOĞAN<sup>d</sup>  
Kerem URAL<sup>e</sup>

Aydın Adnan Menderes University,  
Faculty of Veterinary, Department of  
Internal Medicine, Aydın

ORCID<sup>a</sup>: 0000-0002-6261-162X  
ORCID<sup>b</sup>: 0000-0002-7421-1543  
ORCID<sup>c</sup>: 0000-0002-7833-5519  
ORCID<sup>d</sup>: 0000-0001-5141-5108  
ORCID<sup>e</sup>: 0000-0003-1867-7143

\*Sorumlu Yazar: Cansu BALIKÇI  
E-Posta: balikcicansu98@gmail.com

Geliş Tarihi: 03.04.2023  
Kabul Tarihi: 02.05.2023

14 (1): 49-58, 2023  
DOI: 10.38137/vftd.1276374

### Makale atfı

Balıkçı, C. ve ark. (2023). Gut-Heart Axis, Veteriner  
Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni, 14 (1), 49-58.  
DOI: 10.38137/vftd.1276374

## KALP BAĞIRSAK EKSENİ

**ÖZET.** Bağırsak-kalp ekseninde birçok etkileşim rol oynamaktadır. Bunlara bağırsak epitelyal disfonksiyonu, disbiyoz, bütirat üreten bakteriler, safra asitleri ve bağırsak mikroplarından türetilen metabolitler dahildir. Kalp yetmezliği (KY) olan hastalarda perfüzyonun azalması, konjesyonun artması ve sempatik aracılı vazokonstriksiyona bağlı olarak bağırsakta mikrodolaşım bozuklukları sonucu mukozal emilim bozukluğu, bağırsak duvarı ödemi ve bariyer disfonksiyonu gelişir. Toksik, patojenik, immünojenik ve inflamatuvar faktörler, bağırsaktaki sıkı bağlantıların hasar görmesi sonucu bağırsak geçirgenliğinin artmasıyla mukozadan geçerek sistemik dolaşıma ulaşarak lokal-sistemik inflamasyona neden olur. KY'de sıklıkla görülen bağırsak florasını değiştirerek dysbiosis'e neden olan birçok faktör, bakteriyel aşırı çoğalmaya, bakteriyel translokasyona ve lipopolisakkarit (LPS), trimetilamin N-oksit (TMAO), p-kresilsülfat (PCS) ve indoksil sülfat (IS) gibi birçok toksik maddenin oluşumuna yol açar. Bağırsak geçirgenliğinin artmasına bağlı olarak bu toksik maddeler sistemik dolaşıma ulaşır; Tromboz, trombosit invazyonu, köpük hücre oluşumu ve inflamasyon süreçlerinde rol oynayarak ateroskleroz riskini artırır. Gastrointestinal sistem üzerinde birçok etkisi olan kısa zincirli yağ asitlerinden biri olan bütirat seviyelerinin azalması, bağırsak bariyer bütünlüğünü korumak dahil; köpük hücre oluşumunu teşvik eder, disbiyozu şiddetlendirir ve endotoksinlerin genel dolaşıma ulaşmasına neden olarak bağırsak bariyer fonksiyonunun bozulmasında rol oynar. Bu derleme ile bağırsak-kalp eksenindeki fizyopatolojik süreçler hakkında güncel literatür ışığında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bağırsak geçirgenliği, Disbiyoz, IS, SCFA, TMAO.

## GUT-HEART AXIS

**ABSTRACT.** Many interactions play a role in the gut-heart axis. These include intestinal epithelial dysfunction, dysbiosis, butyrate-producing bacteria, bile acids, and intestinal microbe-derived metabolites. In patients with heart failure (HF), mucosal malabsorption, intestinal wall edema and barrier dysfunction develop as a result of microcirculation disorders in the gut due to decreased perfusion, increased congestion and sympathetically mediated vasoconstriction. Toxic, pathogenic, immunogenic and inflammatory factors, through the increase in intestinal permeability as a result of damaged tight junctions in the intestine, pass through the mucosa and reach the systemic circulation, causing local-systemic inflammation. Many factors that cause dysbiosis by changing the intestinal flora, which are frequently seen in HF, lead to bacterial overgrowth, bacterial translocation and formation of many toxic substances, including lipopolysaccharide (LPS), trimethylamine N-oxide (TMAO), p-cresylsulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS). Depending on the increase in intestinal permeability, these toxic substances reach the systemic circulation; it increases the risk of atherosclerosis by playing a role in thrombosis, platelet invasion, foam cell formation and inflammation processes. Decreased levels of butyrate, one of the short-chain fatty acids that have many effects on the gastrointestinal tract, including maintaining intestinal barrier integrity; It promotes foam cell formation, exacerbates dysbiosis, and plays a role in the disruption of intestinal barrier function, causing endotoxins to reach the general circulation. With this review, it is aimed to inform about the physiopathological processes in the gut-heart axis, in the light of the current literature.

**Keywords:** Dysbiosis, IS, Intestinal permeability, SCFA, TMAO



## INTRODUCTION

The gastrointestinal tract (GIT) is colonized by many various of microorganisms. This community of microorganisms is called the intestinal microbiota and its homeostasis is important because it plays a key role in physiological-pathological conditions (Mondo et al., 2019). The duties of the gut microbiota include digestion of indigestible nutrients, vitamin-hormone synthesis, immunomodulation, and prevention of colonization by opportunistic pathogens (Lerner et al., 2021). The main function of the intestinal barrier mechanism, which can be defined as selective, is to prevent the absorption of toxins while ensuring the absorption of nutrients (Bischoff et al., 2014). Many harmful substances that affect the pathophysiological processes by reaching the systemic circulation are produced by the intestinal microbiota, but these substances cannot enter the circulation unless the intestinal barrier function is impaired (Bischoff et al., 2014). Gut microbiota catabolically participates in the digestion process via saccharolytic and proteolytic pathways and provides the production of short-chain fatty acids (SCFA). SCFA's have multiple effects on the GIT and play a role in modulating cardiovascular risk factors (Edwards et al., 2017). This review focuses on factors involved in the gut-heart axis, including intestinal epithelial dysfunction, dysbiosis, butyrate-producing bacteria, bile acids, and metabolites derived from gut microbes.

## INTESTINAL EPITHELIAL DYSFUNCTION IN HEART DISEASES

In heart failure (HF), microcirculation disorders occur in the intestine due to decreased perfusion, increased congestion and sympathetic vasoconstriction; functional damage to intestinal epithelium may happen as a result of ischemia (Rogler and Rosano, 2014; Kamo et al., 2017a). Mucosal malabsorption, intestinal barrier disorder and edema in the intestinal wall may occur due to decreased perfusion and impaired microcirculation in the intestine (Sandek et al., 2007). In the study of Sandek et al. (2007) in dogs with HF, an increase in ileum and colon wall thickness was determined due to edema in the intestinal wall. In another study (Arutyunov et al., 2008), they determined collagen deposition in the small intestine mucosa in HF patients.

Low blood oxygen pressure causes GIT

dysmotility, intestinal acidosis, and barrier dysfunction (Fruhwald et al., 2007). Decreased GI motility may exacerbate the neuroendocrine compensatory mechanism of HF, as well as changes in gut flora and function (Ralls et al., 2014). Taking into account elevated intestinal permeability as a result of dysfunction in the intestinal barrier; induction of the immune system by toxic, pathogenic, immunogenic and inflammatory agents results in chronic inflammation (Lerner et al., 2021). Chronic inflammation also plays a role in the pathogenesis of cardiovascular diseases (CVD) (Dregan et al., 2014). In HF patients, the increase in intestinal permeability determined by the sugar cellobiose test was associated with right atrial pressure and C-Reactive Protein (CRP) values (Sandek et al., 2007; Pasini et al., 2016). It has been reported that endotoxins induce cytokine production by their effects on mononuclear cells in HF patients (Anker et al., 1997). Researches previously indicated elevated cytokines of inflammatory origin (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ST2, interleukin-6, CRP and galectin-3) in HF patients, associating them with poor prognosis (Hori and Yamaguchi, 2013; Mann, 2015). These inflammatory cytokines play a role in the pathogenesis of HF by inducing cardiomyocyte apoptosis, hypertrophy and fibrosis (Mann, 2015). They also cause an increase in inflammatory reactions by disrupting the intestinal barrier function (Sandek et al., 2007). The higher level of endotoxin levels in hepatic venous blood compared to left ventriculus at decompensation stage denoted that endotoxins enter the central circulation from the intestine (Peschel et al., 2003).

## GUT MICROBIOTA IN HEART DISEASES

There are many factors that can cause dysbiosis in patients with HF, such as insufficient oxygen supply due to decreased intestinal perfusion and consequently increased colonization of pathogenic anaerobic bacteria, sudden changes in fluid balance, GI dysmotility and nutrient deprivation (Sandek et al., 2014; Salzano et al., 2020a). All these factors cause bacterial overgrowth and bacterial translocation (Salzano et al., 2020a). Wang et al. (2012), have shown that the colon microbiota is altered after intestinal ischemia-reperfusion in rats. In the study by Dinakaran et al. (2014), examining the microbiome in people with HF; after the determination of higher bacterial DNA and different microbiota composition in HF patients, elimination of gram-negative bacilli with polymyxin B

resulted in a decrease in fecal endotoxin levels and an improvement in endothelial functions.

Dogs with congestive heart failure (CHF) had higher rates of adhesive bacterial species (eg, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*) on the mucosa compared to healthy controls (Sandek et al., 2007). Adhesive bacteria cause chronic inflammation by attaching to the intestinal epithelium without invasion/translocation, inducing cytokine release and increasing intestinal permeability (Alverdy et al., 1994) or mixing of microbial products into the systemic circulation (Conraads et al., 2004). Seo et al. (2020) reported that *Enterobacteriaceae* and *Escherichia coli* increased and dysbiosis developed in their pilot study in dogs with CHF. Regarding trials comparing patients with coronary heart disease (cHD) with those without, cHD cases presented a diminished relative abundance of *Bacteroidetes phylum* and an elevated ratio of *Firmicutes* (Cui et al., 2017); it has been reported that the levels of several *Streptococcus* species and genus of *Enterobacteriaceae* family are increased (Jie et al., 2017). It has been shown that the abundance of many pathogenic bacteria (including *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia Enterolytica* and *Candida spp.*) is increased (Pasini et al., 2016) while the abundance of *Eubacterium rectale* and *Dorea longicatena* (SCFA producers) decreased (Kamo et al., 2017b) in HF patients. More atherosclerotic plaque detection in mice fed germ-free conditions and a low-cholesterol diet than the control group (Stepankova et al., 2010); as supported by some researchers (Chistiakov et al., 2015; Battson et al., 2018), it proves that intestinal microbiota has an atherosclerosis preventive effect by affecting lipid metabolism.

Bacteria can transmit genes that can enable other bacteria to acquire antibiotic resistance or suppress the immune system. This is called luminal gene transfer (Deshmukh et al., 2011). Cardiogenic dysbiosis may be formed as a result of the transfer of foreign cardiogenic genes, which increase due to changing environmental factors, by luminal gene transfer and may play a role in the pathogenesis of heart diseases (Reif and Lerner, 2004; Lerner et al., 2021):

#### **Butyrate Producing Bacteria**

Indigestible fibers in food are converted by some anaerobic bacteria in the microbiota into SCFs (acetate, propionate, butyrate), which have many effects on the

GI tract including maintaining intestinal barrier integrity (Morrison and Preston, 2016; Edwards et al., 2017). SCFAs also modulate CVD risk factors by lowering blood pressure, antienflamatuar effect and regulating glucose-lipid metabolism (Edwards et al., 2017). Butyrate, which is the main energy source of the colon mucosa, regulates the expression of various genes (related to microbial balance, intestinal barrier function, inflammation, phagocytosis, differentiation, efferocytosis), inhibits intestinal permeability by upregulating tight junctions in the intestine so limits the access of endotoxins to the systemic circulation (Fluitman et al., 2018; Bastin and Andreelli, 2020). The reduction of butyrate production due to the decrease in dietary fiber causes CVD by playing a role in foam cell formation. In addition, the decrease in butyrate level causes dysbiosis and deterioration in intestinal barrier function; Increasingly pathogenic bacteria and their metabolites reach the systemic circulation, results in local-systemic inflammation, foam cell formation, platelet aggregation and so atherosclerosis (Chen et al., 2020; Trøseid et al., 2020).

Jie et al. (2017) report a reduced amount of *Roseburia intestinalis* and *Faecalibacterium prausnitzii* (butyrate producers) in CVD patients. *Roseburia intestinalis* improves intestinal barrier function, reduces systemic inflammation, circulating lipopolysaccharide (LPS) levels, and macrophage migration to plaques (Jie et al., 2017). *Roseburia intestinalis* and *Akkermansia muciniphila* have been shown to inhibit the development of atherosclerotic plaques in mice (Li et al., 2016; Jie et al., 2017). It has been reported that the abundance of *Faecalibacterium prausnitzii*, which has high anti-inflammatory activity, decreases in patients with high cholesterol values (Khan et al., 2018). In addition to producing butyrate, *Clostridium butyricum* increases the abundance and diversity of other butyrate-producing bacteria (Weng et al., 2015; Jia et al., 2017).

#### **Bile Acids**

Bile acids are signal molecules with regulatory effects. These effects are related to energy, glucose, lipid metabolism and other physiological processes (Watanabe et al., 2006; Staels and Fonseca, 2009). Due to the bile acid receptor expression in cardiomyocyte, bile acids influence cardiovascular system, as well as the interaction between bile acid metabolites and the intestinal microbiome, which

plays a role in the formation of heart diseases (Khurana et al., 2011; Forkosh and Ilan, 2019). Primary bile acids are converted to secondary bile acids by intestinal bacteria before they are absorbed from the gut and enter the enterohepatic circulation (Chiang, 2009). This bile acid conversion plays a role in the interaction of the intestinal microbiome with the cardiovascular system, through its agonistic effect on bile acid receptors (such as the farnesoid X receptor) (Chiang, 2009). Mayerhofer et al. (2017) reported that the secondary bile acid: primary bile acid ratio is increased in patients with HF and this is associated with a poor prognosis. Administration of ursodeoxycholic acid in patients with HF has demonstrated improvement in peripheral blood flow and improvement in liver functions (Von Haehling et al., 2012).

#### GUT MICROBE-DERIVED METABOLITES IN HEART DISEASES

Metabolites produced by intestinal bacteria have been shown to play a role in the development of various diseases (Schroeder and Bäckhed, 2016). As a result of an imbalance in the intestinal microbiota resulting in dysbiosis, many harmful substances such as Phenylacetylglutamine (PAGln), LPS, Trimethylamine N-Oxide (TMAO), p-cresylsulfate (PCS) and indoxyl sulfate (IS) are released and the intestinal barrier is damaged due to the decrease of SCFAs (Cosola et al., 2018; Nemet et al., 2020). Due to the increased permeability of the damaged intestinal barrier, these toxic substances reach the systemic circulation and play a role in the pathogenesis of CVD by causing platelet invasion, thrombosis, foam cell formation, inflammatory response and oxidative stress (Chen et al., 2020).

##### **PAGln**

Phenylalanine is a PAGln precursor and is largely absorbed from the small intestine after ingestion with food. The unabsorbed part is converted to phenylpyruvic acid and then to phenylacetic acid by the microbiota in the large intestine, absorbed in the portal system and metabolized to PAGln in the liver. PAGln causes thrombocytosis and thrombosis through G-protein coupled receptors ( $\alpha 2A$ ,  $\alpha 2B$  and  $\beta 2$ -adrenergic receptors) (Nemet et al., 2020). Chen et al. (2020), report that PAGln correlates positively with CVD and poor prognosis. Chen et al. report that PAGln is positively correlated with CVD and poor prognosis, therefore it may be a biomarker for CVD.

##### **LPS**

LPS is a molecule composed of lipids and polysaccharides found in the cell wall of gram-negative bacteria. When there is an increase in permeability due to damage to the intestinal wall, LPS reaches the systemic circulation and induces inflammatory reactions by acting on cardiomyocytes, cardiac fibroblasts, macrophages and monocytes through Toll like receptor (TLR)-4 recognition receptors (Sandek et al., 2007; Deitch, 2002; Lu et al., 2008; Frangogiannis, 2014).

A high level of LPS in plasma has been detected in patients with CHF, indicating that severe venous occlusion is an important factor for bacterial overgrowth and increased intestinal permeability during the edematous decompensation process (Niebauer et al., 1999; Marshall and Levy, 2011). As a result of a study evaluating LPS levels in 516 people (age: 50-79), it was determined that the risk of atherosclerosis increased 3 times in those with LPS levels above the 90th percentile (Fokosh and Ilan, 2019). High serum LPS levels as a result of dysbiosis are associated with metabolic syndrome obesity, coronary heart disease (CHD) and diabetes (Kallio et al., 2015; Chen et al., 2020).

##### **Uremic Toxins**

Indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate, which are formed as a result of fermentation of dietary tryptophan and tyrosine by intestinal bacteria, are defined as uremic toxins (Lekawanvijit, 2015). A comparative evaluation of germ-free and conventional mouse plasmas exhibited that the gut microbiota has a significant impact on uremic toxins and other metabolites (Wikoff et al., 2009). Among the uremic toxins, indoxyl sulfate, as evidenced by its causation of cardiac hypertrophy and renal damage in rodents; It causes cardiac and renal prohypertrophic-profibrotic effect (Lekawanvijit, 2015). In addition to reporting that indoxyl level correlates negatively with prognosis in those with chronic renal disease (Barreto et al., 2009), there is also a study that high indoxyl sulfate levels in healthy mice cause LV hypertrophy without affecting renal function (Yang et al., 2015).

##### **TMAO**

Trimethylamine (TMA) precursors (such as choline, betaine, L-carnitine) found in western diet (red meat, fish, eggs, dairy products, sugar, saturated fats) is

converted to TMA by microbial enzymes called carnitine monooxygenase (cntA/B), yeaW/X, choline-TMA (cut C/D), TMAO reductase and betaine reductase (Pascal et al., 1984; Andreesen, 1994; Cracium et al., 2014; Koeth et al., 2014; Zhu et al., 2014; Salzano et al., 2020a). TMA, which enters the circulation from the intestine, is oxidized to TMAO in the liver by FMO1 and especially FMO3, which belongs to the family of hepatic flavin monooxidases (Bennett et al., 2013).

According to literature data, *Gammaproteobacteria* (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella*, *Citrobacter spp.* and *Providencia spp.*), *Actinobacteria*, *Firmicutes* (*Sporosarcina spp.*), *Betaproteobacteria* (*Achromobacter spp.*), *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri* and *Proteus mirabilis* are TMA producing bacteria (Romano et al., 2015; Wang et al., 2015; Zeisel and Warrier, 2017; Janerio et al., 2018). In addition, Bäckhed (2013) reports that TMA level is positively correlated with *Clostridiaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Clostridium* abundance and negatively correlated with *Lachnospira* abundance. Nutrition with a Western diet increases the TMAO levels and increases the risk of CVH by changing the composition of the microbiota with the decrease in the abundance of *Bifidobacteria*, *Bacteroides* and the increase in the levels of *Proteobacteria*, *Firmicutes* (Koeth et al., 2013; Boutagy et al., 2015; Chen et al., 2017). According to another study, TMAO level is associated with the abundance of *Shigella* and *Escherichia* (Hayashi et al., 2018).

TMAO is thought to play a role in the pathogenesis of CVD by increasing myocardial fibrosis, stimulating cytokines, causing cardiac microvascular dysfunction and neurohormonal imbalances (Nagatomo and Tang, 2015). Depending on the similar prognostic value of TMAO in ischemic and non-ischemic patients, it has been reported that TMAO has a direct harmful effect on the heart, independent of its atherogenic effect (Tang et al., 2014; Nagatomo and Tang, 2015). By affecting intracellular calcium utilization and cardiomyocyte contraction, TMAO causes mitochondrial dysfunction and consequently a decrease in energy production (Savi et al., 2018).

While TMAO increases forward cholesterol transport, it inhibits macrophage reverse cholesterol transport, causing foam cell formation in the endothelial wall, resulting in plaque formation and inflammation.

(Wang et al., 2011; Tang et al., 2014). In plaque or arterial areas with low laminar flow, LDL accumulates and oxidizes, then macrophages are attracted to this area and collect lipoproteins, resulting in inflammatory foam cells that release chemotactic cytokines and generate a monocyte response (Charo and Taub, 2011; Bentzon et al., 2014). In addition, foam cells secrete vascular permeability molecules that can cause plaque rupture and thus thrombosis and ischemia (Bentzon et al., 2014).

Studies in patients undergoing acute HF, acute myocardial infarction, and coronary angiography have associated high TMAO levels with hospitalization, myocardial infarction, stroke, and death (Tang et al., 2013; Suzuki et al., 2016; Suzuki et al., 2017). In the study of Organ et al. (2016), mice fed with TMAO or choline and compared with control groups; They identified LV enlargement, aortic stenosis, pulmonary edema, cardiac fibrosis, elevated brain natriuretic peptide (BNP) levels, and exacerbated cardiac remodeling. Tang et al. (2015) report that an increase in TMAO level is associated with LV diastolic dysfunction, but not with systolic dysfunction. They found that in 972 patients with HF, patients with high TMAO levels were highly elderly, decreased heart rate, hemoglobin levels, blood pressure, kidney function, and LV ejection fraction, as well as increased NT proBNP and potassium levels (Suzuki et al., 2016). It has been demonstrated that TMAO is a stronger indicator because NT-proBNP loses its significance when adjusted for CRP (Schuett et al., 2017). In addition, it has been reported that it is more beneficial to consider TMAO and BNP together in the risk stratification of patients with HF with preserved ejection fraction, whose BNP is less elevated (Salzano et al., 2020b). In animals with myocardial infarction, by targeting the intestinal microbiota; It was observed that TMAO levels and myocardial hypertrophy decreased also HF regressed (Martin et al., 2008).

## REFERENCES

- Alverdy, J. C., Spitz, J., Hecht, G. & Ghandi, S. (1994). Causes and consequences of bacterial adherence to mucosal epithelia during critical illness. *New horizons* (Baltimore, Md.), 2 (2), 264-272.
- Andreesen, J. R. (1994). Glycine metabolism in anaerobes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 66 (1), 223-237.
- Anker, S. D., Egerer, K. R., Volk, H. D., Kox, W. J., Poole-Wilson, P. A. & Coats, A. J. (1997). Elevated



- soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *The American Journal of Cardiology*, 79 (10),1426-1430.
- Bäckhed, F. (2013). Meat-metabolizing bacteria in atherosclerosis. *Nature Medicine*, 19 (5), 533-534.
- Bastin, M. & Andreelli, F. (2020). The gut microbiota and diabetic cardiomyopathy in humans. *Diabetes & Metabolism*, 46 (3),197-202.
- Battson, M. L., Lee, D. M., Weir, T. L. & Gentile, C. L. (2018). The gut microbiota as a novel regulator of cardiovascular function and disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 56, 1-15.
- Bennett, B. J., de Aguiar Vallim, T. Q., Wang, Z., Shih, D. M., Meng, Y., Gregory, J., Allaye, H., Lee, R., Graham, M., Crooke, R., Edwards, P. A., Hazen, S. L. & Lusis, A. J. (2013). Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metabolism*, 17 (1), 49-60.
- Bentzon, J. F., Otsuka, F., Virmani, R. & Falk, E. (2014). Mechanisms of plaque formation and rupture. *Circulation Research*, 114 (12), 1852-1866.
- Bischoff, S. C., Barbara, G., Buurman, W., Ockhuizen, T., Schulzke, J. D., Serino, M., Tilg, H., Watson, A. & Wells, J. M. (2014). Intestinal permeability—a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterology*, 14 (1), 1-25.
- Boutagy, N. E., Neilson, A. P., Osterberg, K. L., Smithson, A. T., Englund, T. R., Davy, B. M., Hulver, M. W. & Davy, K. P. (2015). Probiotic supplementation and trimethylamine-N-oxide production following a high-fat diet. *Obesity*, 23 (12), 2357-2363.
- Charo, I. F. & Taub, R. (2011). Anti-inflammatory therapeutics for the treatment of atherosclerosis. *Nature reviews Drug Discovery*, 10 (5), 365-376.
- Chen, W., Zhang, S., Wu, J., Ye, T., Wang, S., Wang, P. & Xing, D. (2020). Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 507, 236-241.
- Chiang, J. Y. (2009). Bile acids: regulation of synthesis: thematic review series: bile acids. *Journal of Lipid Research*, 50 (10), 1955-1966.
- Chistiakov, D. A., Bobryshev, Y. V., Kozarov, E., Sobenin, I. A. & Orekhov, A. N. (2015). Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response. *Frontiers in Microbiology*, 6, 671.
- Conraads, V. M., Jorens, P. G., De Clerck, L. S., Van Saene, H. K., Ieven, M. M., Bosmans, J. M., Schuerwegh, A., Bridts, C. H., Wuyts, F., Stevens, W. J., Anker, S. D., Rauchhaus, M. & Vrints, C. J. (2004). Selective intestinal decontamination in advanced chronic heart failure: a pilot trial. *European Journal of Heart Failure*, 6 (4), 483-491.
- Cosola, C., Rocchetti, M. T., Cupisti, A. & Gesualdo, L. (2018). Microbiota metabolites: Pivotal players of cardiovascular damage in chronic kidney disease. *Pharmacological Research*, 130, 132-142.
- Craciun, S., Marks, J. A. & Balskus, E. P. (2014). Characterization of choline trimethylamine-lyase expands the chemistry of glyceryl radical enzymes. *ACS Chemical Biology*, 9 (7), 1408-1413.
- Cui, L., Zhao, T., Hu, H., Zhang, W. & Hua, X. (2017). Association study of gut flora in coronary heart disease through high-throughput sequencing. *BioMed Research International*, 2017.
- Deitch, E. A. (2002). Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings? *Surgery*, 131 (3), 241-244.
- Deshmukh, H. A., Maiti, A. K., Kim-Howard, X. R., Rojas-Villarraga, A., Guthridge, J. M., Anaya, J. M. & Nath, S. K. (2011). Evaluation of 19 autoimmune disease-associated loci with rheumatoid arthritis in a Colombian population: evidence for replication and gene-gene interaction. *The Journal of Rheumatology*, 38 (9), 1866-1870.
- Dinakaran, V., Rathinavel, A., Pushpanathan, M., Sivakumar, R., Gunasekaran, P. & Rajendhran, J. (2014). Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS one*, 9 (8), e105221.
- Dregan, A., Charlton, J., Chowienczyk, P. & Gulliford, M. C. (2014). Chronic inflammatory disorders and risk of type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, and stroke: a population-based cohort



- study. *Circulation*, 130 (10), 837-844.
- Edwards, C. A., Havlik, J., Cong, W., Mullen, W., Preston, T., Morrison, D. J. & Combet, E. (2017). Polyphenols and health: Interactions between fibre, plant polyphenols and the gut microbiota. *European Uremic Toxin Work Group (EUTox)* (2009). Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease patients. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 4 (10), 1551-1558.
- Falconi, C. A., Junho, C. V. D. C., Fogaça-Ruiz, F., Vernier, I. C. S., Da Cunha, R. S., Stingham, A. E. M. & Carneiro-Ramos, M. S. (2021). Uremic toxins: an alarming danger concerning the cardiovascular system. *Frontiers in Physiology*, 667.
- Fluitman, K. S., Wijdeveld, M., Nieuwdorp, M. & IJzerman, R. G. (2018). Potential of butyrate to influence food intake in mice and men. *Gut*, 67 (7), 1203-1204.
- Forkosh, E. & Ilan, Y. (2019). The heart-gut axis: new target for atherosclerosis and congestive heart failure therapy. *Open Heart*, 6 (1), e000993.
- Frangogiannis, N. G. (2014). The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodelling. *Nature Reviews Cardiology*, 11 (5), 255-265.
- Fruhwald, S., Holzer, P. & Metzler, H. (2007). Intestinal motility disturbances in intensive care patients pathogenesis and clinical impact. *Intensive Care Medicine*, 33 (1), 36-44.
- Hayashi, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Kami, K., Yoshida, N., Tabata, T., Emoto, T., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Irino, Y., Toh, R., Shinohara, M., Okada, Y., Ogawa, W., Tamada, T. & Hirata, K. I. (2018). Gut microbiome and plasma microbiome-related metabolites in patients with decompensated and compensated heart failure. *Circulation Journal*, 83 (1), 182-192.
- Hori, M. & Yamaguchi, O. (2013). Is tumor necrosis factor- $\alpha$  friend or foe for chronic heart failure? *Circulation Research*, 113 (5), 492-494.
- Janeiro, M. H., Ramírez, M. J., Milagro, F. I., Martínez, J. A. & Solas, M. (2018). Implication of trimethylamine N-oxide (TMAO) in disease: potential biomarker or new therapeutic target. *Nutrients*, 10 (10), 1398.
- Jia, L., Li, D., Feng, N., Shamoan, M., Sun, Z., Ding, L., Zhang, Z., Chen, W., Sun, J. & Chen, Y. Q. (2017). Anti-diabetic effects of *Clostridium butyricum* CGMCC0313. 1 through promoting the growth of gut butyrate-producing bacteria in type 2 diabetic mice. *Scientific Reports*, 7 (1), 1-15.
- Jie, Z., Xia, H., Zhong, S. L., Feng, Q., Li, S., Liang, S., ... & Kristiansen, K. (2017). The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Communications*, 8 (1), 1-12.
- Kallio, K. A., Hätönen, K. A., Lehto, M., Salomaa, V., Männistö, S. & Pussinen, P. J. (2015). Endotoxemia, nutrition, and cardiometabolic disorders. *Acta Diabetologica*, 52 (2), 395-404.
- Kamo, T., Akazawa, H., Suzuki, J. I. & Komuro, I. (2017a). Novel concept of a heart-gut axis in the pathophysiology of heart failure. *Korean Circulation Journal*, 47(5):663-669.
- Kamo, T., Akazawa, H., Suda, W., Saga-Kamo, A., Shimizu, Y., Yagi, H., ... & Komuro, I. (2017b). Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PloS one*, 12 (3), e0174099.
- Khan, T. J., Ahmed, Y. M., Zamzami, M. A., Siddiqui, A. M., Khan, I., Baothman, O. A., ... & Yasir, M. (2018). Atorvastatin treatment modulates the gut microbiota of the hypercholesterolemic patients. *Omic: a Journal of Integrative Biology*, 22 (2), 154-163.
- Khurana, S., Raufman, J. P. & Pallone, T. L. (2011). Bile acids regulate cardiovascular function. *Clinical and Translational Science*, 4 (3), 210-218.
- Koeth, R. A., Levison, B. S., Culley, M. K., Buffa, J. A., Wang, Z., Gregory, J. C., ... & Hazen, S. L. (2014).  $\gamma$ -Butyrobetaine is a proatherogenic intermediate in gut microbial metabolism of L-carnitine to TMAO. *Cell Metabolism*, 20(5), 799-812.
- Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., ... & Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*, 19 (5), 576-585.
- Lekawanvijit, S. (2015). Role of gut-derived protein-bound uremic toxins in cardiorenal syndrome and potential treatment modalities. *Circulation*

- Journal, 79 (10), 2088-2097.
- Lerner, A., Steigerwald, C. & Matthias, T. (2021). Feed your microbiome and your heart: The gut-heart axis. *Front Biosci*, 26, 468-477.
- Li, J., Lin, S., Vanhoutte, P. M., Woo, C. W. & Xu, A. (2016). *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in Apoe<sup>-/-</sup> mice. *Circulation*, 133 (24), 2434-2446.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42 (2), 145-151.
- Mann, D. L. (2015). Innate immunity and the failing heart: the cytokine hypothesis revisited. *Circulation Research*, 116 (7), 1254-1268.
- Marshall, B. M. & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24 (4), 718-733.
- Martin, F. P. J., Wang, Y., Sprenger, N., Yap, I. K., Lundstedt, T., Lek, P., ... & Nicholson, J. K. (2008). Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Molecular Systems Biology*, 4 (1), 157.
- Milani, R. V., Mehra, M. R., Endres, S., Eigler, A., Cooper, E. S., Lavie Jr, C. J. & Ventura, H. O. (1996). The clinical relevance of circulating tumor necrosis factor- $\alpha$  in acute decompensated chronic heart failure without cachexia. *Chest*, 110 (4), 992-995.
- Mondo, E., Marliani, G., Accorsi, P. A., Cocchi, M. & Di Leone, A. (2019). Role of gut microbiota in dog and cat's health and diseases. *Open Veterinary Journal*, 9 (3), 253-258.
- Morrison, D. J. & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7 (3), 189-200.
- Nagatomo, Y., & Tang, W. W. (2015). Intersections between microbiome and heart failure: revisiting the gut hypothesis. *Journal of Cardiac Failure*, 21 (12), 973-980.
- Nemet, I., Saha, P. P., Gupta, N., Zhu, W., Romano, K. A., Skye, S. M., ... & Hazen, S. L. (2020). A cardiovascular disease-linked gut microbial metabolite acts via adrenergic receptors. *Cell*, 180 (5), 862-877.
- Niebauer, J., Volk, H. D., Kemp, M., Dominguez, M., Schumann, R. R., Rauchhaus, M., ... & Anker, S. D. (1999). Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *The Lancet*, 353 (9167), 1838-1842.
- Organ, C. L., Otsuka, H., Bhushan, S., Wang, Z., Bradley, J., Trivedi, R., ... & Lefler, D. J. (2016). Choline diet and its gut microbe-derived metabolite, trimethylamine N-oxide, exacerbate pressure overload-induced heart failure. *Circulation: Heart Failure*, 9 (1), e002314.
- Pasini, E., Aquilani, R., Testa, C., Baiardi, P., Angioletti, S., Boschi, F., ... & Dioguardi, F. (2016). Pathogenic gut flora in patients with chronic heart failure. *JACC: Heart Failure*, 4 (3), 220-227.
- Peschel, T., Schönauer, M., Thiele, H., Anker, S., Schuler, G. & Niebauer, J. (2003). Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *European Journal of Heart Failure*, 5 (5), 609-614.
- Ralls, M. W., Miyasaka, E. & Teitelbaum, D. H. (2014). Intestinal microbial diversity and perioperative complications. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 38 (3), 392-399.
- Reif, S. & Lerner, A. (2004). Tissue transglutaminase—the key player in celiac disease: a review. *Autoimmunity Reviews*, 3 (1), 40-45.
- Rogler, G. & Rosano, G. (2014). The heart and the gut. *European Heart Journal*, 35 (7), 426-430.
- Romano, K. A., Vivas, E. I., Amador-Noguez, D. & Rey, F. E. (2015). Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide. *MBio*, 6 (2), e02481-14.
- Salzano, A., Cassambai, S., Yazaki, Y., Israr, M. Z., Bernieh, D., Wong, M. & Suzuki, T. (2020a). The gut axis involvement in heart failure: focus on trimethylamine N-oxide. *Heart Failure Clinics*, 16 (1), 23-31.
- Salzano, A., Israr, M. Z., Yazaki, Y., Heaney, L. M., Kanagala, P., Singh, A., ... & Suzuki, T. (2020b). Combined use of trimethylamine N-oxide with BNP for risk stratification in heart failure with preserved ejection fraction: findings from the

- DIAMONDHFpEF study. *European Journal of Preventive Cardiology*, 27 (19), 2159-2162.
- Sandek, A., Bauditz, J., Swidsinski, A., Buhner, S., Weber-Eibel, J., von Haehling, S., ... & Anker, S. D. (2007). Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *Journal of the American College of Cardiology*, 50 (16), 1561-1569.
- Sandek, A., Swidsinski, A., Schroedl, W., Watson, A., Valentova, M., Herrmann, R., ... & Bauditz, J. (2014). Intestinal blood flow in patients with chronic heart failure: a link with bacterial growth, gastrointestinal symptoms, and cachexia. *Journal of the American College of Cardiology*, 64 (11), 1092-1102.
- Savi, M., Bocchi, L., Bresciani, L., Falco, A., Quaini, F., Mena, P., ... & Del Rio, D. (2018). Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced impairment of cardiomyocyte function and the protective role of urolithin B-glucuronide. *Molecules*, 23 (3), 549.
- Schroeder, B. O., & Bäckhed, F. (2016). Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine*, 22 (10), 1079-1089.
- Schuett, K., Kleber, M. E., Scharnagl, H., Lorkowski, S., März, W., Niessner, A., ... & Meinitzer, A. (2017). Trimethylamine-N-oxide and heart failure with reduced versus preserved ejection fraction. *Journal of the American College of Cardiology*, 70 (25), 3202-3204.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C. M. & Finlay, B. B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiological Reviews*.
- Seo, J., Matthewman, L., Xia, D., Wilshaw, J., Chang, Y. M. & Connolly, D. J. (2020). The gut microbiome in dogs with congestive heart failure: a pilot study. *Scientific Reports*, 10 (1), 1-9.
- Staels, B. & Fonseca, V. A. (2009). Bile acids and metabolic regulation: mechanisms and clinical responses to bile acid sequestration. *Diabetes Care*, 32 (2), S237-S245.
- Stepankova, R., Tonar, Z., Bartova, J., Nedorost, L., Rossman, P., Poledne, R., ... & Tlaskalova-Hogenova, H. (2010). Absence of microbiota (germ-free conditions) accelerates the atherosclerosis in ApoE-deficient mice fed standard low cholesterol diet. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*, 17 (8), 796-804.
- Suzuki, T., Heaney, L. M., Bhandari, S. S., Jones, D. J. & Ng, L. L. (2016). Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure. *Heart*, 102 (11), 841-848.
- Suzuki, T., Heaney, L. M., Jones, D. J. & Ng, L. L. (2017). Trimethylamine N-oxide and risk stratification after acute myocardial infarction. *Clinical Chemistry*, 63 (1), 420-428.
- Swann, J. R., Want, E. J., Geier, F. M., Spagou, K., Wilson, I. D., Sidaway, J. E., ... & Holmes, E. (2011). Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (Supplement 1), 4523-4530.
- Tang, W. W., & Hazen, S. L. (2014). The contributory role of gut microbiota in cardiovascular disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 124 (10), 4204-4211.
- Tang, W. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., ... & Hazen, S. L. (2013). Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *New England Journal of Medicine*, 368 (17), 1575-1584.
- Tang, W. W., Wang, Z., Shrestha, K., Borowski, A. G., Wu, Y., Troughton, R. W., ... & Hazen, S. L. (2015). Intestinal microbiota-dependent phosphatidylcholine metabolites, diastolic dysfunction, and adverse clinical outcomes in chronic systolic heart failure. *Journal of Cardiac Failure*, 21 (2), 91-96.
- Trøseid, M., Andersen, G. Ø., Broch, K. & Hov, J. R. (2020). The gut microbiome in coronary artery disease and heart failure: Current knowledge and future directions. *EBioMedicine*, 52, 102649.
- Von Haehling, S., Schefold, J. C., Jankowska, E. A., Springer, J., Vazir, A., Kalra, P. R., ... & Anker, S. D. (2012). Ursodeoxycholic acid in patients with chronic heart failure: a double-blind, randomized, placebo-controlled, crossover trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 59 (6), 585-592.
- Wang, F., Li, Q., Wang, C., Tang, C. & Li, J. (2012).

- Dynamic alteration of the colonic microbiota in intestinal ischemia-reperfusion injury. *PloS one*, 7 (7), e42027.
- Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., DuGar, B., ... & Hazen, S. L. (2011). Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*, 472 (7341), 57-63.
- Wang, Z., Roberts, A. B., Buffa, J. A., Levison, B. S., Zhu, W., Org, E., ... & Hazen, S. L. (2015). Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell*, 163 (7), 1585-1595.
- Watanabe, M., Houten, S. M., Matakı, C., Christoffolete, M. A., Kim, B. W., Sato, H., ... & Auwerx, J. (2006). Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 439 (7075), 484-489.
- Wikoff, W. R., Anfora, A. T., Liu, J., Schultz, P. G., Lesley, S. A., Peters, E. C. & Siuzdak, G. (2009). Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (10), 3698-3703.
- Zeisel, S. H. & Warrier, M. (2017). Trimethylamine N-oxide, the microbiome, and heart and kidney disease. *Annual Review of Nutrition*, 37, 157-181.
- Zhang, Y., Wang, Y., Ke, B. & Du, J. (2021). TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Translational Research*, 228, 109-125.
- Zhu, Y., Jameson, E., Crosatti, M., Schäfer, H., Rajakumar, K., Bugg, T. D. & Chen, Y. (2014). Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111 (11), 4268-4273.