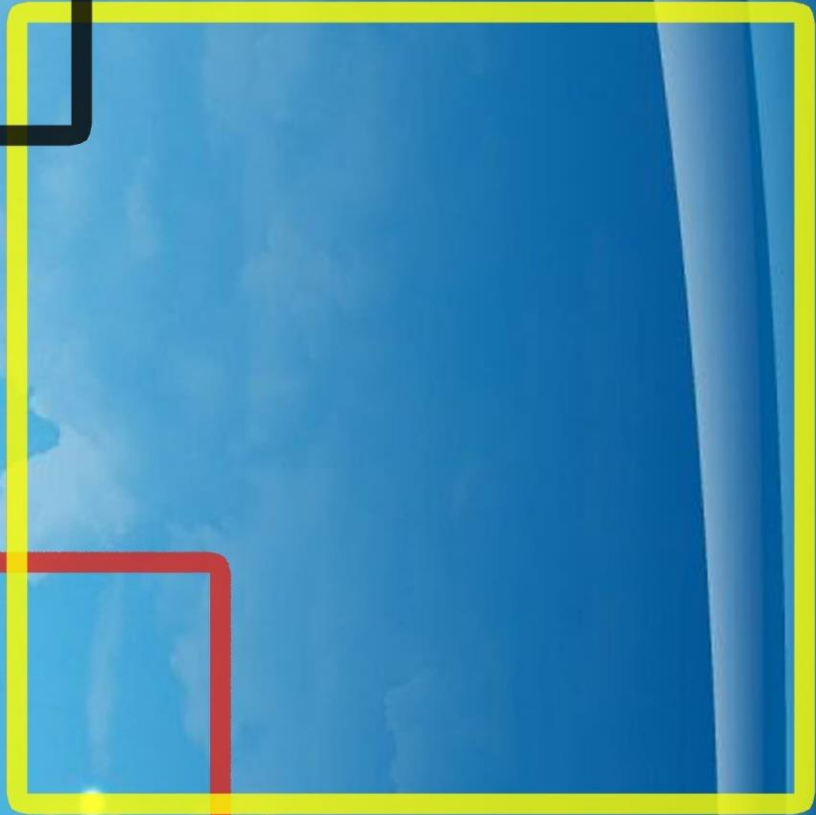




VAN VETERINARY JOURNAL

Year: 2024 / Volume: 35 / Issue: 1

ISSN : 2149-3359
e-ISSN : 2149-8644





March - 2024



VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Musa GENÇCELEP (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Cumali ÖZKAN

Van YU, Faculty of Veterinary, Journal Editorial, 65080 - Campus / Van - Turkey

Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27 e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editors (Editorial Board)

Assist. Prof. Dr. Caner KAYIKCI (Co-Editor)

Assoc. Prof. Dr. Osman YILMAZ (Technical Editor)

Assist. Prof. Dr. Nebi ÇETİN (Technical Editor)

Assist. Prof. Dr. Yağmur KUŞCU (Technical Editor)

Assist. Prof. Dr. Mehmet YILDIZ (Technical Editor)

Assoc. Prof. Dr. Gamze ÇAKMAK (Language Editor)

Assist. Prof. Dr. Mustafa ÖZBEK (Language Editor)

Prof. Dr. Abdullah YEŞİLOVA (Statistical Editor)

Assoc. Prof. Dr. Sadi ELASAN (Statistical Editor)

Res. Assist. Veyssel DELİBAŞ (Electronic Journal Editor)

Assist. Prof. Dr. Ahmet Fatih DEMİREL (Electronic Journal Editor)

Assist. Prof. Dr. Halil Cumhuri YILMAZ (Electronic Journal Editor)

Assoc. Prof. Dr. Bekir OĞUZ (Proof Quality Editor)

Assoc. Prof. Dr. Adnan AYAN (Proof Quality Editor)

Assoc. Prof. Dr. Abdullah KARASU (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Leyla MİS (Section Editor)

Assoc. Prof. Dr. Turan YAMAN (Section Editor)

Assist. Prof. Dr. Tuncer ÇAKMAK (Section Editor)

Assist. Prof. Dr. Çağrı KALE (Section Editor)

Publication Board

Dr. Abdullah KAYAR (Istanbul University-Cerrahpasa)

Dr. Ahmet Cihat ÖNER (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Ali Evren HAYDARDEDEOĞLU (Aksaray University)

Dr. Ali Rıza BABAOĞLU (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Ardavan FARHADI (Shantou University - China)

Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas University - Kyrgyzstan)

Dr. Axel WEHREND (Giessen University - Germany)

Dr. Aynur ŞİMŞEK (Dicle University)

Dr. Bahattin ÇAK (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Behnam ROSTAMÍ (Zanjan University - Iran)

Dr. Bengi ÇINAR KUL (Ankara University)

Dr. Cihat ÖZTÜRK (Kirsehir Ahi Evran University)

Dr. Cristian MAGDAS (SAMV University - Romania)

Dr. Davut KOCA (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Ehab ABU-BASHA (Jordan University (JUST) - Jordan)

Dr. Ejaz AHMAD (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)

Dr. Faina SHAKİROVA (Kazan State Academy - Russia)

Dr. Feraye ESEN GURSEL (Istanbul-Cerrahpasa University)

Dr. Gert W. NIEBAUER (Vetmeduni Vienna - Austria)

Dr. Golam KİBRİA (CVAS University - Bangladesh)

Dr. James M. MAY (Vanderbilt University - USA)

Dr. Jose Ramiro GONZALEZ MONTANA (University of Leon - Spain)

Dr. M. Saleem AKHTAR (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)

Dr. Madalina G. ALBU KAYA (INCETP Institute - Romania)

Dr. Mehmet YÜCEL (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Memiş BOLACALI (Kirsehir Ahi Evran University)

Dr. Mian Muhammed AWAİS (Bahauddin Zakariya University - Pakistan)

Dr. Mojtaba RAEİSÍ (Golestan university - Iran)

Dr. Murat GÜZEL (Ondokuz Mayıs University)

Dr. Okan EKİM (Ankara University)

Dr. Omar ATROOZ (Mutah University - Jordan)

Dr. Omar BELLANDA (University of Republic - Uruguay)

Dr. Orhan YILMAZ (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Ornampai JAPA (Phayao University - Thailand)

Dr. Reşit ALDEMİR (Van Yüzüncü Yil University)

Dr. Serkan YILDIRIM (Atatürk University)

Dr. Tahereh MOHAMMADABADI (Khuzestan University - Iran)

Dr. Tohid Rezaei TOPRAGGALEH (Tabriz University - Iran)

Dr. Ulaş ACARÖZ (Afyon Kocatepe University)

Dr. Volkan KOŞAL (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Yeter DEĞER (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Yunus ÇETİN (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)

Advisory Board

Dr. Abdullah KAYA (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Abeer F. El NAHAS (Alexandria University - Egypt)

Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU (Ankara University)

Dr. Cenk YARDIMCI (Ondokuz Mayıs University)

Dr. Durmuş Alpaslan KAYA (Hatay Mustafa Kemal University)

Dr. Engin KENNERMAN (Bursa Uludag University)

Dr. Füsün TEMAMOĞLU (Harran University)

Dr. Hüseyin KARADAĞ (Istanbul Gelisim University)

Dr. Mecit YÖRÜK (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Nihat MERT (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Oğuz KUL (Kirikkale University)

Dr. Ömer BEŞALTI (Ankara University)

Dr. Saadet BELHAN (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Suphi DENİZ (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Taylan AKSU (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Turan ÇİVELEK (Ayfyon Kocatepe University)

Dr. Yakup Can SANCAK (Van Yuzuncu Yil University)

Dr. Yılmaz ARAL (Ankara University)

Dr. Zabit YENER (Van Yuzuncu Yil University)

This journal is published three times a year. Journal Tittle Abbreviation: **Van Vet J**

All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanveti>

Year

Volume

Issue

2024

35

1

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Turkiye Atif Dizini



March - 2024



VAN VETERINARY JOURNAL

This journal previously published as: **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

Scientific Board of This Issue

Prof. Dr. Ali Doğan ÖMÜR (Ataturk University)	Assoc. Prof. Dr. Yalçın AKBULUT (Kafkas University)
Prof. Dr. Derviş ÖZDEMİR (Ataturk University)	Assist. Prof. Dr. Ali Rıza BABAOĞLU (Van Yuzuncu Yil University)
Prof. Dr. Duygu BAKI ACAR (Afyon Kocatepe University)	Assist. Prof. Dr. Besime DOĞAN DAŞ (Harran University)
Prof. Dr. Fahrettin ALKAN (Selcuk University)	Assist. Prof. Dr. Derya Merve KARAGÖZ (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)
Prof. Dr. Gökhan OTO (Van Yuzuncu Yil University)	Assist. Prof. Dr. Gökhan BOZKURT (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)
Prof. Dr. Mehmet Erdem AKBALIK (Dicle University)	Assist. Prof. Dr. Mehmet IRMAK (Siirt University)
Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK (Selcuk University)	Assist. Prof. Dr. Muhammet Hanifi SELVİ (Necmettin Erbakan University)
Prof. Dr. Şadiye KUM (Aydın Adnan Menderes University)	Assist. Prof. Dr. Murat METLİ (Mugla Sitki Kocman University)
Prof. Dr. Şükrü Hakan ATALGIN (Balikesir University)	Assist. Prof. Dr. Sadık Serkan AYDIN (Harran University)
Prof. Dr. Şule SANAL (Ondokuz Mayıs University)	Assist. Prof. Dr. Songül YÜCA (Bolu Abant İzzet Baysal University)
Assoc. Prof. Dr. Duygu MUTLUAY (Burdur Mehmet Akif Ersoy University)	Assist. Prof. Dr. Tolga ALTAŞ (Duzce University)
Assoc. Prof. Dr. Emre OZAN (Ondokuz Mayıs University)	Assist. Prof. Dr. Veysel DOĞAN (Kastamonu University)
Assoc. Prof. Dr. Gökhan ASLIM (Selcuk University)	Dr. Zeynep SOYER SARICA (Erciyes University)
Assoc. Prof. Dr. Tunahan SANCAK (Sivas Cumhuriyet University)	

This journal is published three times a year. Journal Title Abbreviation: Van Vet J
All articles in this journal are available free of charge from <https://dergipark.org.tr/tr/pub/vanveti>

Year	Volume	Issue
2024	35	1

This journal indexed / abstracted in Asos Index, CAB Abstracts, EBSCOhost, Google Scholar, Index Copernicus, Sobiad, TR Dizin and Türkiye Atf Dizini

Original Articles

- **Köm M, Akay İ, Polat E, Çalık İ.** Ratlarda İntrabdominal Adezyonların Üzerine Trombositten Zengin Plazma'nın Etkisi (Effect of Platelet Rich Plasma on Intraabdominal Adhesions in Rats) **1-6**
- **Ambarcıoğlu P, Ünsal Adaca A.** An Assessment on the Experiences of Distance Education of Students at Veterinary Faculty of Ankara University (Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Uzaktan Eğitim Deneyimleri Üzerine Bir Değerlendirme) **7-26**
- **Karapınar Z, Timurkan MÖ.** Detection and Molecular Characterization of *Canine Coronavirus* Based on Partial Membrane Gene Sequences (Canine Coronavirusun Tespiti ve Kısmi Membran Gen Dizisi Temelli Moleküler Karakterizasyonu) **27-31**
- **Nuhoğlu Öztürk Z, Tokur O, Aksoy A.** Comparative Efficacy of the Dimethyl Sulfoxide, Glycerol and Methanol on the Post-Thaw Cell Viability of HeLa Cells (Dimetil Sülfoksit, Gliserol ve Metanol'ün HeLa Hücrelerinin Çözdürme Sonrası Hücre Canlılığı Üzerindeki Karşılaştırmalı Etkinliği) **32-37**
- **Demir İE, Altaçlı S.** Kedi ve Köpeklerde Obezitenin Hayvan Sahiplerinin Profilleri ile Birlikte Değerlendirilmesi (Evaluation of Obesity in Cats and Dogs together with the Profiles of Pet Owners) **38-46**
- **Yıldız S.** Tablası Alınmış Çerezlik Ayçiçek Hasılımı Farklı Katkılarla Silolamanın Silaj Kalitesi, In-Vitro Sindirilebilirlikleri ve Enerji İçeriğine Etkisi (The Effect of Ensiling of Headless Confectionary Sunflower Crop Mixed with Various Additives on Silage Quality, In-Vitro Digestibility, and Energy Content) **47-52**
- **Yıldız S, Rağbetli MÇ, Tülüce Y.** Farklı Dozlarda Uygulanan Streptozotosinin Sıçan Karaciğerine Etkilerinin Stereolojik Metotlarla İncelenmesi (Investigation of the Effects of Streptozotocin Applied in Different Doses on Rat Liver with Stereological Methods) **53-58**
- **Uslu D, Uslu S.** Immunohistochemical Investigation of Autophagy in the Uterus during the First Trimester of Pregnancy in Rats (Ratlarda Gebelikte Birinci Trimesterde Uterusta Otofajinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması) **59-63**
- **Kırmızıbayrak T, Karadağ S, Boğa Kuru B.** Slaughter and Carcass Traits of Gray Hungarian and German Mast Geese (Gri Macar ve Alman Mast Kazlarının Kesim ve Karkas Özellikleri) **64-69**
- **Delibaş V, Soygüder Z, Göya C, Aslan L, Çakmak G.** Three-Dimensional Examination of Humerus and Antebrachium Bones in the Red hawk (*Buteo Rufinus*) with Computed tomography (CT) (Kızıl Şahinde (*Buteo Rufinus*) Humerus ve Antebrachium Kemiklerinin Bilgisayarlı tomografi (BT) ile Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi) **70-76**

Original Articles

- **Küçükoflaz M, Kocaoğlu Güçlü B, Özbek V, Sarıözkan S.** Buzağlarda Probiyotik ve Mannan-Oligosakkarit Kullanımının Performans, Hastalık, Yaşama Oranı ve Karlılık Üzerine Etkisi (Effect of Probiotic and Mannan-Oligosaccharide Use on Performance, Disease, Survival Rate and Profitability in Calves) **77-82**
- **Budak D.** Effects of Nano Selenium on Some Metabolic and Rumen Parameters in Dorper Sheep (Dorper Koyunlarında Bazı Metabolik ve Rumen Parametreleri Üzerine Nano Selenyumun Etkileri) **83-88**
- **Yıldız M, Şendağ S.** Süt İneklerinde Meme Başı Kanalının Ultrasonografik Değerlendirilmesi (Ultrasonographic Evaluation of the Teat Canal in Dairy Cows) **89-93**
- **Yıldız C, Erol İ.** The Effects on Post-Thaw Sperm Quality and Nuclear DNA Integrity of Supplementation of Low-Density Lipoprotein to Freezing Extender in the Mouse (Farelerde Sperma Sulandırıcısına Düşük Yoğunluklu Lipoprotein İlavesinin Dondurma Çözdürme Sonrası Sperm Kalitesi ve Nükleer DNA Bütünlüğü Üzerine Etkileri) **94-100**



Ratlarda İntraabdominal Adezyonların Üzerine Trombositten Zengin Plazma'nın Etkisi

Mustafa KÖM¹, İlyas AKAY¹, Eren POLAT¹, İlknur ÇALIK²

¹Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Cerrahi Anabilim Dalı, 23119, Elazığ, Türkiye

²Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, 23119, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi: 02.11.2023

Kabul Tarihi: 20.12.2023

ÖZ

Cerrahi alanındaki teknolojik gelişmelere rağmen intraabdominal adezyonlar; kısırlık, abdominopelvik ağrı ve bağırsak tıkanıklıklarının en önemli nedenlerinden biridir. Bu çalışmada; trombositten zengin plazma (PRP)'nin intraabdominal adezyonların önlenmesindeki etkinliğinin ortaya konulması amaçlandı. Çalışmada 4 aylık 25 adet erkek Sprague Dawley ırkı rat kullanıldı. Ratlar her grupta 10 rat olmak üzere iki eşit gruba ayrıldı. Beş rat ise donör olarak kullanıldı. Bu ratlardan elde edilen kanlardan RRP hazırlandı. Genel anestezi altında operasyonlar klasik cerrahi kuralları altında iliosekal bölge açığa çıkarıldı ve 1 cm²'lik bir bölge travmatize edildi. Birinci grup kontrol olarak değerlendirildi ve herhangi bir kimyasal uygulanmadı. İkinci gruptaki ratlara PRP 0.4 ml dozunda lokal olarak uygulandı. Postoperatif 14. günde relaparotomi yapıldı. Sonuçlar makroskopik ve histopatolojik olarak değerlendirildi. PRP grubunun adezyon derecesi ve fibrozis dereceleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptandı (p<0.05). PRP ve kontrol grupları arasında inflamasyon derecesi bakımından anlamlı bir farkın olmadığı gözlemlendi (p>0.05). Sonuç olarak, PRP'nin intraabdominal adezyonları önlemede daha etkili olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: İntraabdominal adezyon, PRP, Siçan.

ABSTRACT

Effect of Platelet Rich Plasma on Intraabdominal Adhesions in Rats

Despite the development of surgical technologies, intraabdominal adhesions are one of the most important problems for infertility, abdominopelvic pain, and intestinal obstruction. This study was aimed the efficiency of PRP (Platelet Rich Plasma) on preventing postoperative intraabdominal adhesions. In this study, 25 male Sprague Dawley breed rats of 4 months old were used. They were divided into 2 groups equally. Five rats were used as donor and obtained PRP. Following general anesthesia and under routine procedures, all groups were traumatized 1 cm² area on the ileocecal region while group 1 was served as control with no chemical, the group 2 was locally applied PRP. Relaparotomy was made on the 14 days after surgery. The results were evaluated macroscopically and histopathologically. Adhesion and fibrosis scores of PRP group were observed to have significantly decreased compared to the control (p<0.05). There was no significant difference in inflammation between the PRP and control groups (p>0.05). In conclusion, it was determined that PRP was more effective on the preventive of intraabdominal adhesions.

Keywords: Intraabdominal adhesion, PRP, Rat.

GİRİŞ

Zaman içerisinde gelişen cerrahi tekniklere rağmen intraabdominal adezyonlar hâlâ en önemli komplikasyonlardan biridir. Abdominal operasyonları takiben en çok karşılaşılan komplikasyonlar olan intraabdominal adezyonlar bağırsak ve üretrada tıkanıklıklara, karın ağrılarına ve kadınlarda infertilitelere neden olmaktadır. Günümüzde postoperatif intraabdominal adezyonların oluşumunu önlemek amacıyla yaygın olarak uygulanan laparoskopik cerrahiye rağmen başta batı ülkelerinde olmak üzere bağırsak tıkanıklığı olgularının en önemli sebebi intraabdominal adezyonlardır. Abdominal operasyonları takiben

vakaların %60-94'ünde adezyon oluşur fakat bu oranın sadece %24-32'si klinik semptom gösterir. Bu oranlar intraabdominal adezyonların ekonomik boyutunu göstermesi bakımından oldukça önemlidir (Boland ve Weigel 2006; Kamel 2010; Ward ve Panintch 2011; Beyene ve ark. 2015; Tang ve ark. 2020; Ghobrial ve ark. 2023).

İntraabdominal adezyonların sayısı ve derecesinin azaltılması için yapılması gerekenler; minimal cerrahi tekniğin uygulanması, dokuların mekanik olarak ayrılması ve adezyon oluşumunu önleyici ilaçların kullanılması şeklinde üç başlıkta toplanmaktadır (Boland ve Weigel 2006; Trew 2006; Arung ve ark. 2011;



Schnüriger ve ark. 2011; Ward ve Panintch 2011; Beyene ve ark. 2015; De Pascale ve ark. 2015; Köm 2015). Günümüzde, trombositlerin sadece basit bir hemostaz görevi ile kalmayıp başka birçok fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir. Hücre diferansiyasyonu sağlayan büyüme faktörlerini içeren trombositler; salındığı zaman hücre mitozu, hasarlı bölgeye diğer hücrelerin göçünün sağlanması ve kollajen yapısının artmasına neden olurlar. PRP, 1990'li yıllardan itibaren klinik spor hekimliği, oftalmoloji, nöroşirurji, üroloji, kozmetik, ortopedi ve maksillofasiyal cerrahi, diş hekimliği, plastik cerrahi, beyin cerrahisi, çene cerrahisi ve yumuşak doku cerrahisinde yaygın bir klinik kullanımı alanına sahiptir (Fresno ve ark. 2010; Arnoczky ve Shebani-Rad 2013; Marques ve ark. 2015; Alves ve Grimalt 2018; Abdullah ve ark. 2019; Le ve ark. 2019; Zhang ve ark. 2019; Tang ve ark. 2020; Akbarzadeh ve ark. 2021; Collins ve Alexander 2021; Nikolovska ve ark. 2021; Oneto ve Etulain 2021).

Bu çalışmada; ratlarda intraabdominal adezyonları önlemede PRP'nin etkinliğinin ortaya konulması amaçlandı.

MATERYAL VE METOT

Etik Onay ve Deneklerin Hazırlanması

Bu çalışmanın deneysel aşamaları, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 16/02/2022 tarih, 2022/03 oturum ve 6931 sayılı onayı ile Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde (FÜDAM) gerçekleştirildi. Tüm operasyonlar FÜDAM koşullarında yapıldı. Deneyde 4 aylık yaşında toplam 25 adet inbreed Spraque Dawley ratları kullanıldı. Ratlar her grupta 10 adet olacak şekilde 2 gruba ayrıldı. Kalan 5 rat ise donör olarak PRP'ler elde edildi. Ratlar standart kafeslerde ve oda sıcaklığında muhafaza edildi.

Anestezi Protokolü

Genel anestezi için 8 saat öncesinden aç bırakılan ratlara ilk önce 20 mg/kg xylazine hydrochloride (Basilazin® %2, 20 mg/ml, Bavet, İstanbul) ve 5 dk. sonra 40 mg/kg ketamine hydrochloride (Alfamine® %10, 100 mg/ml, Alfasan, İzmir) intramusküler uygulandı.

PRP'nin Hazırlanması

Çalışmada elde edilen PRP'ler Abdullah ve ark. (2019) tanımladığı kriterlere göre hazırlandı. Çalışmanın 2. grubuna uygulanacak olan PRP'ler; genel anestezi uygulanmış ratlardan intrakardiyal olarak alınan kanlardan elde edildi. İlk önce antikoagülanlı tüplere alınan kanlar 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek eritrositlerin tüpün alt kısmında toplanması sağlanarak kan elemanlarına ayrıştırıldı. Bu yöntemle PRP ve Trombositten Fakir Plazma (PPP), kırmızı kan hücrelerinden ayrılarak tüpün en üst kısmında toplandı. Üst kısımdaki plazma pipet yardımıyla alınarak başka steril tüplere konuldu. İkinci aşamada 4000 rpm 7 dakikalık ikinci kez santrifüj işlemi yapıldı. PRP ve PPP'lerde ayrıştırıldı. Farklı tüplere alınarak operasyonda kullanıma hazır hale getirildi. Çalışmamızda PRP için herhangi bir aktivatör kullanılmadı. PRP'ler cerrahi işlem öncesi hazırlandığından, operasyon süresinde herhangi bir uzama ve zaman kaybı yaşanmadı.

Deney Grupları ve Operasyon Tekniği

Anestezinin ardından operasyon bölgesi tıraş ve dezenfekte edildi. Operasyon masasına sırtüstü yatırılan ratlarda median hat boyunca 2 cm'lik bir laparotomi

yapılarak iliösekal bölge açığa çıkarıldı. İliösekal bölgede 1x1 cm'lik bir alan diş fırçası ile noktasal kanamalar görülünceye kadar travmatize edildi (Köm 2013).

Kontrol grubuna (1. grup) travmatize edilen alana herhangi bir medikal tedavi uygulanmadı. PRP grubundaki (2. grup) ratlara operasyondan önceden hazırlanan PRP'ler 0.4 cc dozunda travmatize edilen bölgeye lokal olarak verildi.

Daha sonra bağırsaklar anatomik pozisyonuna uygun olarak karın boşluğuna yerleştirildi. Karın kasları 4/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon, İstanbul) ile sürekli dikişlerle, deri ise 3/0 polyglactin 910 (Vicryl, Ethicon, İstanbul) ile basit ayrı dikişler kapatıldı. Deney sonrasında tüm ratlara 0.1mg/100g seftiofur hidroklorid (50 mg/ml, Ceftipure, Alke ilaç, İstanbul) antibiyotik ve 500 mg/kg meloksikam (5 mg/1ml, Bavet Meloksikam, İstanbul) analjezik tek doz olarak uygulandı. Tüm cerrahi operasyonlar aynı kişi tarafından cerrahi tekniğine uygun olarak yapıldı.

Deneyin Sonlandırılması

Ratlar postoperatif 14. günde CO₂ solutarak ötenazi edildi. Ratlar, her iki kosta yaylarının alt kısmından ters U insizyonu ile karın boşluğu ortaya çıkarıldı. Makroskopik değerlendirmeler, gruplar hakkında bilgisi olmayan bir başka hekim tarafından yapıldı.

Makroskopik Değerlendirmeler

Karın boşluğunda meydana gelen adezyonların makroskopik değerlendirmeleri Nair ve ark. (1974) tarafından belirlenen derecelendirme kriterleri dikkate alınarak yapıldı (Tablo 1).

Histopatolojik Değerlendirmeler

Makroskopik sonuçlar kaydedildikten sonra alınan doku örnekleri histopatolojik değerlendirmelerin yapılması amacıyla Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'na gönderildi. Alınan doku örnekleri %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra parafin bloklara yerleştirildi. Doku örnekleri 3-5 mikron kalınlıkta kesildikten sonra kesitler Hematoksilin & Eozin (HE) ve Masson's Trichrome (MT) boyaları ile boyanarak, Histopatolojik yönden fibrozis ve inflamasyon değerlendirme bulguları Hooker ve ark. (1999) tarafından belirlenen derecelendirme kriterlerine göre yapıldı (Tablo 1).

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizleri SPSS (22.0 Versiyon) programı kullanılarak yapıldı. Grupların adezyon derecesi, fibrozis ve inflamasyon dereceleri arasındaki dağılım ve sapma oranları dikkate alınarak, gruplar arasındaki aritmetik ortalamalar arasındaki farkın önemlilik analizi Mann Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Analizlerde p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Postoperatif Bulgular

Postoperatif dönemde kontrol grubundaki ratların bir tanesi 3. günde iki tanesi ise 4. günde öldü. PRP grubundaki ratlarda herhangi bir ölüm olayı ile karşılaşmadı. Kontrol grubundaki ölen ratların nekropsilerinde aşırı serözite ve apse oluşumları gözlemlendi. Kontrol grubundaki eksik olan ratlar tamamlandı. Çalışmadaki ratlarda operasyon yaralarına ait herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmadı.

Tablo 1: Adezyonların makroskopik, fibrozis ve inflamasyon değerlendirme kriterleri.**Table 1:** Evaluation criterias of macroscopic, fibrosis, and inflammation of adhesions.

Derece	Makroskopik Derecesi	Fibrozis Derecesi	İnflamasyon Derecesi
0	Herhangi bir adezyon yok	Yok	Yok
1	Organlar kendi arasında/organlar ile karın duvarı arasında yalnız bir adezyon bandı oluşumu	Hafif	Dev hücre, plazma hücresi, lenfosit
2	Organlar kendi arasında/organlar ile karın duvarı arasında iki adet adezyon bant oluşumu	Orta	Dev hücre, plazma hücresi, eozinofil, nötrofil
3	Organlar kendi arasında/organlar ile karın duvarı arasında ikiden fazla bant oluşumu veya karın duvarına adezyon olmaksızın tüm barsakların kitle oluşumu	Ağır	Çok sayıda inflamatuvar hücre, mikroapseler
4	Adezyon bantlarının sayısı ve yaygınlığına bakılmadan bir organın karın duvarına adezyon oluşumu		

Makroskopik Bulgular

Çalışmamızda kontrol grubundaki ratlar ötenazi edildikten sonra abdomen içerisinde yapılan incelemelerde; iki ratta 1. derece, iki ratta 2. derece ve beş ratta ise 3. derece adezyon gözlemlendi (Şekil 1a, b, c). Kontrol grubunda sadece bir ratta 4. derece adezyon gözlemlendi (Şekil 1d), (Tablo 2). Kontrol grubundaki ratlarda ileri derecede adezyon görülmesi nedeniyle yüksek adezyon evreleri kaydedildi.

PRP grubundaki ratların intraabdominal incelemelerinde ise, bir ratta herhangi bir adezyon şekillenmedi. Dört ratta 1. derece, dört ratta 2. derece ve bir ratta ise 3. derece adezyon gözlemlendi (Tablo 2). Grupların makroskopik adezyon dereceleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında, kontrol grubundaki ratlarda PRP grubundaki ratlara oranla adezyon şiddetinin anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0.0334$) (Tablo 3).

Histopatolojik Bulgular

Fibrozis Bulguları

Fibrozis yönünden yapılan değerlendirmelerde; fibröz bağdoku artışı, hücreden zengin ve genç granülasyon dokusu özelliğinde idi. Hafif ve orta dereceli fibrozisler ise sırasıyla "1. derece" ve "2. derece" olarak değerlendirildi (Şekil 2a, b). Gruplar arasında "3. derece" olarak değerlendirilen fibrozis bağırsağın serozasında yoğun ve kalın bir bağdoku oluşturan lezyonlar için ağır olarak tanımlandı. (Şekil 2c). Tüm fibrozis incelemeleri fibroblast hücre yoğunluğunu daha iyi değerlendirmek

için rutin HE boyamasının üzerine MT boyaması yapılmıştır (Şekil 3a, b).

Fibrozis açısından incelenmesi sonucunda; kontrol grubunda 3 ratta 1. derece, 6 ratta 2. derece ve 1 ratta ise 3. derece gözlemlendi. PRP grubunda ise 2 ratta herhangi bir fibrozis gözlemlenmedi. Beş ratta 1. derece, 3 ratta ise 2. derece fibrozis lezyonu gözlemlendi (Tablo 2). Gruplar arasındaki fibrozis dereceleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında kontrol grubunda, PRP grubuna göre adezyonların anlamlı olarak arttığı saptandı ($p=0,0485$), (Tablo 3).

İnflamasyon Bulguları

İnflamasyon değerlendirmeleri bakımından yangısal infiltrasyon yoğunluğu ile esas alınarak derecelendirilmesi yapıldı. Hafif yangısal hücre infiltrasyonu "1. derece", orta derecede olanı "2. derece" ve lezyonların çok şiddetli olduğu yangısal infiltrasyonlar ise "3. derece" olarak değerlendirildi (Şekil 4a, b, c).

İnflamasyon bulguları değerlendirildiğinde kontrol grubundaki 3 ratta 1, 5 ratta 2 ve 2 ratta ise 3. derece inflamasyon geliştiği görülmüştür. PRP grubunda ise 2 ratta herhangi bir inflamasyon lezyonu izlenmedi. Beş ratta 1. derece, 3 ratta ise 2. derece inflamasyon şekillendiği tespit edilmiştir (Tablo 2). Gruplar arasındaki inflamasyon dereceleri Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldığında; kontrol grubunun PRP grubuna göre inflamasyonu anlamlı derecede arttığı saptandı ($p=0.1594$), (Tablo 3).

Tablo 2: Grupların adezyon, fibrozis ve inflamasyon sayısı ve derece dağılımları.**Table 2:** The distributions of number and degree of macroscopic, fibrosis, and inflammation of groups.

Değerlendirme Kriterleri	Gruplar	0. derece	1. derece	2. derece	3. derece	4. derece
Adezyon	Kontrol	-	2	2	5	1
	PRP	1	4	4	1	-
Fibrozis	Kontrol	-	3	6	1	-
	PRP	2	5	3	-	-
İnflamasyon	Kontrol	-	3	6	1	-
	PRP	-	6	4	-	-

Tablo 3: Grupların makroskopik, fibrozis ve inflamasyonların istatistiksel analizleri.**Table 3:** Statistical analysis of macroscopic, fibrosis, and inflammation of groups.

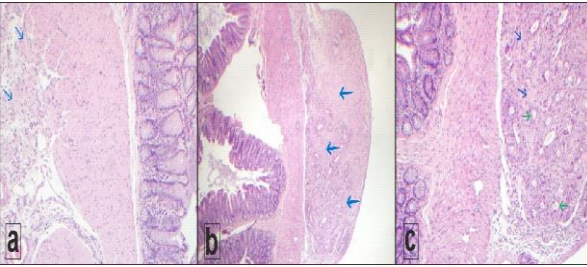
Değerlendirme Kriterleri	Gruplar		p değeri
	Kontrol	PRP	
Adezyon	2.50±0.97	1.50±0.85	0.0334
	3.00 (1.00-4.00)	1.50 (0.00-4.00)	
Fibrozis	1.80±0.63	1.10±0.74	0.0485
	2.00 (1.00-3.00)	1.00 (0.00-3.00)	
İnflamasyon	1.80±0.63	1.40±0.52	0.1594
	2.00 (1.00-3.00)	1.00 (0.00-3.00)	

Veriler ortalama ve standart sapma ile ortanca değer minimum maksimum olarak sunulmuştur. Gruplar Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmıştır ($p<0.05$).



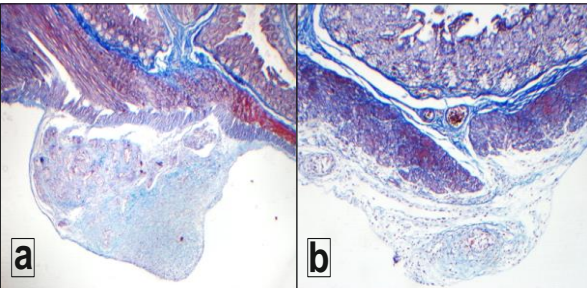
Şekil 1: Kontrol grubundaki 1. derece (a), 2. derece (b), 3. derece (c) ve 4. derece (d) adezyon görünüşleri.

Figure 1: Adhesion appearance of 1st degree (a), 2nd degree (b), 3rd degree (c) ve 4th degree (d) in the control groups.



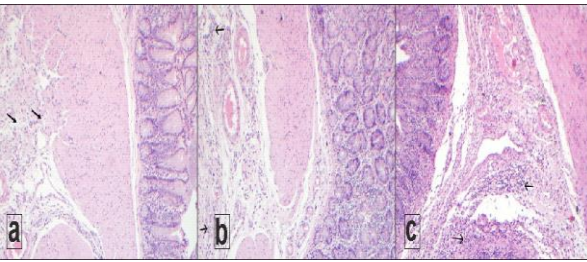
Şekil 2: PRP grubunda 1. derece (a), 2. derece (b); ve kontrol grubunda 3. derece (c) fibrozis görünüşleri (oklar) HE X100.

Figure 2: Fibrosis appearance of 1st degree (a), 2nd degree (b) in the PRP groups, and 3rd degree (c) in the control group, (arrow, HE X100).



Şekil 3: Kontrol grubunda fibröz dokuda artış görünümü, (MT X100) (a); PRP grubunda fibröz dokuda azalması görünümü (b), (MT X100).

Figure 3: Increase appearance of fibrosis in the control group, (a), decrease appearance of fibrosis in the PRP group, (b), (MTX100).



Şekil 4: PRP grubunda 1. derece (a), 2. derece (b), ve 3. derece (c) inflamasyon görünüşleri: (oklar, HE X100).

Figure 4: Inflammation appearance of 1st degree (a), 2nd degree (b), and 3rd degree (c) in the PRP group, (arrow, HE X100).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Laparotomi operasyonlarını takiben ortaya çıkan en önemli komplikasyonlardan biri olan intraabdominal adezyonlar; pelvik ağrı, infertilite, ince bağırsak ve üreter tıkanıklıklarının önemli nedenlerinden biridir. İntraabdominal adezyon gelişen hastaların ilerleyen zamanlarda yapılacak operasyonlarında operasyon süresinin uzaması, bağırsak ve diğer intrabdominal organların yaralanma risklerinin artması gibi olumsuzluklara neden olmaktadır. (Boland ve Weigel 2006; Kamel 2010; Ward ve Panintch 2011; Beyene ve ark. 2015; Tang ve ark. 2020; Ghobrial ve ark. 2023). Zaman içerisinde farklı ve ileri cerrahi teknikler gelişmesine rağmen laparotomi sonrasında hastaların büyük bir çoğunluğunda (%60-94) intraabdominal adezyonlara rastlandığı fakat küçük bir kısmında (%24-32) klinik semptomların görüldüğü bildirilmektedir. İnce bağırsak obstruksiyonlarının %26-75'i, dişilerde infertilitenin %15-24'ü ve ileus olgularının ise %2-5'i intraabdominal adezyonlar kaynaklıdır (Boland ve Weigel 2006; Trew 2006; Arung ve ark. 2011; Schnüriger ve ark. 2011; Tang ve ark. 2020; Ghobrial ve ark. 2023).

İntraabdominal adezyonların önlenmesine yönelik yapılan çalışmalarda tavşan, rat, koyun ve atlar oldukça sık kullanılmıştır (Günay ve ark. 2005; Alkan ve ark. 2007; Yıldız ve ark. 2011; Köm 2013; De Pascale ve ark. 2015; Köm 2015; Marques ve ark. 2015; Le ve ark. 2019; Turan ve ark. 2020; Altıntaş Ural ve ark. 2022). Yapılan bu çalışmada kolay temin edilebilirliği, ekonomik olarak uygun olması ve postoperatif takip sırasında bakım ve beslenmesinin kolay olması nedeniyle rat tercih edildi. İntraabdominal adezyon modeli oluşturulurken periton duvarı, sekum ve ovaryum lezyonlarının oluşturulması en çok tercih edilen tekniklerdir (Günay ve ark. 2005; Alkan ve ark. 2007; Schnüriger 2011; Yıldız ve ark. 2011; Köm 2013; De Pascale ve ark. 2015; Kaya ve ark. 2016; Belebecha ve ark. 2020; Turan ve ark. 2020; Altıntaş Ural ve ark. 2022). Moll ve ark. yaptıkları iki çalışmada; koyunlarda (1992) periton ve uterusları travmatize ederek adezyon modeli oluştururken, ponilerde (1991) ise jejunum'un alt bölümündeki serozal alanı gazlı bezle sıkarak oluşturdukları travmatik alan üzerine katgut ile seromusküler dikiş uygulaması yaparak adezyon modelleri oluşturmayı tercih etmişlerdir. Hay ve ark. (2001) atlarda adezyonu jejunum'un çift yönlü 3 basit seromusküler dikiş uygulaması ile diğer bölgede ise jejunal rezeksiyon ve uçuca anastomoz modeli ile oluşturmuşlardır. Mueller ve ark. (2002) ise, atlarda jejunum rezeksiyonu ve uç-uc anastomoz uygulaması ile intraabdominal adezyon modelini oluşturmuşlardır. Yapılan bu çalışmada ise, adezyon modeli oluşturmak için ileosekal bölgede 1 cm²lik alan dış fırçası yardımıyla bölgesel kanamalar görülene kadar travmatize edildi. Kontrol grubundaki adezyon derecelerinin yüksekliği, oluşturduğumuz adezyon modelinin yeterli olduğunu göstermektedir.

Adezyonların sınıflandırılması için farklı derecelendirme kriterleri uygulanmaktadır (Günay ve ark. 2005; Schnüriger 2011; Yıldız ve ark. 2011; Köm 2013; Abegao ve ark. 2015; De Pascale ve ark. 2015; Kaya ve ark. 2016). Çalışmamızda makroskopik adezyon düzeyinin skorlaması için Nair ve ark. (1974) kullandıkları adezyon skoru kriterlerinden, histopatolojik incelemeler için ise Hooker ve ark. (1999) kullandığı fibrozis ve inflamasyon skoru kriterlerinden yararlanıldı. Bu yöntemler uygulamalarının kolaylığı ve kullandığımız modellemeye uygunluğu sebebiyle tercih edildi.

Postoperatif intraabdominal adezyonların miktarı ve şiddetinin azaltılması için minimum invaziv cerrahi teknikler uygulanmalı, dokular fiziksel ya da solid bariyerler ile mekanik olarak ayrılmalı veya adezyon oluşumunu önleyen ilaçlar kullanılmalıdır (Boland ve Weigel 2006; Kamel 2010; Ward ve Panintch 2011; Yıldız ve ark. 2011; Beyene ve ark. 2015; Tang ve ark. 2020; Ghobrial ve ark. 2023). Adezyonların önlenmesinde profilaksinin önemi büyüktür. İntraabdominal adezyonların medikal olarak önlenmesi veya azaltılması konusunda farklı etki mekanizmalarına sahip çok farklı ilaçların kullanıldığı çalışmalar geçmişten günümüze kadar yapılmaktadır (Trew 2006; Kamel 2010; Arung ve ark. 2011; Tang ve ark. 2020; Ghobrial ve ark. 2023). Bu çalışmada, PRP'nin ratlarda oluşturulan postoperatif intraabdominal adezyonların önlenmesi üzerine olan etkinliğini ortaya koymak amaçlandı.

PRP, otolog kan dokusundan elde edilen ve içerisinde 3-5 kat daha yüksek düzeyde trombosit, büyüme ve pıhtılaşma faktörleri bulunduran hücresel plazma elemanıdır. Yapısındaki trombositlerin granüllerinde depolanmış olan büyüme faktörleri (FGF, VEGF, PDGF, TGF β 1-2 gibi) farklı uyarımlar vasıtasıyla salınarak aktive olmaktadır. PRP uygulamalarıyla birçok büyüme faktörünün belirlenen bölgelere uygulanması ve aynı anda kombine etki göstermesi hedeflenmektedir. PRP'nin içeriği tam olarak anlaşılmağı olmasına rağmen klinik uygulamalarda rekombinant teknolojisine oranla daha iyi sonuçlar elde edilmesi, ekonomik olması, kolay kullanılması, kanamanın kontrol edilmesi, kemik ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırması ümit verici gelişmelerdir (Arnoczky ve Shebani-Rad 2013; Marques ve ark. 2015; Abdullah ve ark. 2019; Le ve ark. 2019; Zhang ve ark. 2019; Collins ve Alexander 2021; Oneto ve Etulain 2021). PRP farklı santrifüjleme yöntemleri ve ticari hazırlama kitleri ile elde edilebilmektedir. Son yıllardaki yeni teknolojik gelişmeler ile birlikte birçok ticari cihaz ve ekipmanlar santrifüj teknolojisinde kullanılarak PRP hazırlanabilmektedir. Ancak maliyet açısından cihazların çok pahalı olması sebebiyle PRP'ler hem ticari kitler yardımıyla hem de santrifüj cihazları yardımıyla araştırmacılar tarafından hazırlanmaktadır (Fresno ve ark. 2010; Alves ve Grimalt 2018; Smith ve ark. 2019; Akbarzadeh ve ark. 2021; Collins ve Alexander 2021; Nikolovska ve ark. 2021; Ghobrial ve ark. 2023). Bu çalışmada, otolog kan dokusundan PRP hazırlama olanaksızlığı sebebiyle 5 adet rattan intrakardiak olarak alınan kanlardan laboratuvar koşullarında 34-45 dakika içerisinde elde edilen PRP'ler hazır olduğu andan itibaren kısa süre içerisinde operasyonla oluşturulan bağırsak defektli bölgesine lokal olarak uygulandı.

PRP'nin yara, eklem ve kemik dokusu üzerine etkilerini inceleyen çeşitli deneysel çalışmalar yapılmış olmasına rağmen tam bir fikir birliği bulunmamaktadır (Fresno ve ark. 2010; Abegao ve ark. 2015; Marques ve ark. 2015; Kaya ve ark. 2016; Alves ve Grimalt 2018; Abdullah ve ark. 2019; Daradka ve ark. 2019; Belebecha ve ark. 2020; Karakaş ve ark. 2020; Turan ve ark. 2020). Fresno ve ark. (2010), domuzlarda PRP'nin bağırsak anastomozları üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında; 72. saat ve 7. günlerdeki incelemelerinde PRP'nin granülasyon dokusu ve fibrozisi arttırdığı, bağırsak patlama gücünü etkilemediğini ifade etmişlerdir. Yılmaz ve ark. (2012), farklı surfaktan maddelerin (poractant ve beractant) intraabdominal adezyon formasyonu üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında surfaktan uygulanan her iki gruptan elde edilen adezyon derecelerinin kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu fakat bu sonucun

istatistiksel olarak anlamlı olmadığını rapor etmişlerdir. Kaya ve ark. (2016), laparotomi operasyonlarında PRP'nin kullanımının intraabdominal adezyonların önlenmesi üzerine etkinliğini araştırdıkları çalışmada PRP, kontrol ve sham grupları arasında adezyon derecesi ve histopatolojik değerlendirmeler açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığını, fibrozis bakımından ise PRP grubunun kontrol grubuna oranda anlamlı derecede düşük olduğunu belirtmişlerdir. Makarchian ve ark. (2017) ratlarda peritoneal adezyon formasyonunun önlenmesi üzerine heparin, PRP, gümüş nanopartikülleri kullandıkları çalışmada tek başına PRP uygulanan grupta adezyon oluşumunun önlenmesinin daha iyi olduğunu bildirmişlerdir. Daradka ve ark. (2019), tavşanlarda bağırsak anastomozunda uyguladıkları sütürları polyglactin 910, normal vicryl, sodyum asetat kaplamalı vicryl ve PRP kaplamalı vicryl ile uygulamış ve PRP kaplamalı vicryl ile uygulanan dikişlerin daha az inflamasyona, daha yoğun bir anjiogenezis ve kollajen depozisyonu sebep olduğunu ifade etmişlerdir. Öztan ve ark. (2019) ise, özefagus yanıklarında, PRP tedavisinin mukozal iyileşme, oksidatif stres ve skatriks dokunun azaltılması bakımından olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir. Belebecha ve ark. (2020), tavşanlarda PRP kaplamalı ve kaplamasız polipropilen mesh uygulamalarının, adezyon parametreleri bakımından herhangi bir farkın oluşturmadığını, postoperatif 60. gündeki takip sonunda PRP kaplamalı polipropilen mesh uygulamalarının myeloperoksidase ve N-acetylglucosaminidase aktivitelerinin düşürdüğünü belirtmişlerdir. Turan ve ark. (2020), tavşanlarda oluşturdukları postoperatif intraabdominal adezyon modelinde; adezyon ve fibrozis dereceleri arasında PRP ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığını, inflamasyon ve anjiogenezis bakımından ise anlamlı farklılık olduğunu belirtmişlerdir. Altıntaş Ural ve ark. (2022), abdominal adezyon modeli oluşturdukları çalışmalarında saf zeytinyağı ile PRP'yi karşılaştırmış ve PRP'nin fibroblastlar ile inflamatuvar hücrelerin çoğalmasını engelleyerek ve mezotelyal hücrelerin çoğalmasını teşvik ederek bağırsak yapışmasını azaltabileceğini belirtmişlerdir. Yapılan bu çalışmada ise, adezyon ve fibrozis dereceleri açısından PRP ve kontrol gruplarındaki ratlar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu saptandı ($p < 0.05$). Kontrol grubundaki tüm ratlarda değişik derecelerde adezyon oluşumunun varlığı gözlemlendi. İnflamasyon derecesi bakımından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($p > 0.05$).

Sonuç olarak; son yıllarda birçok patolojik durumda geniş bir uygulama alanı bulan ve yaygın olarak kullanılan PRP'nin intraabdominal adezyonların önlenmesi üzerine etkinliğini ortaya koymak amacı ile yapılan bu çalışmada; PRP'nin abdominal adezyonları önlenmesinde etkili olduğu gözlemlendi. Tüm veriler değerlendirildiğinde, PRP'nin abdominal adezyon önleyici etkilerinin daha detaylı olarak incelenmesinin gerekliliği ortaya konuldu.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "VF.22.10" proje numarasıyla desteklenmiştir.

Bu çalışma İlyas Akay'ın "Ratlarda trombosit zengin plazmanın karın içi yapışıklıklar üzerine etkisi" başlıklı yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Bu Çalışma 11-12 Kasım 2023 Şanlıurfa 7. Uluslararası Göbeklitepe Bilimsel Çalışmalar Kongresi adlı kongrede sözlü bildiri olarak sunulmuş ve kongre kitabı özet olarak basılmıştır.

Bu çalışmadaki verilerin istatistiksel analizi için F.Ü. Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı'ndan Dr. Beşir ER'e teşekkür ederiz.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MK

Denetleme/Danışmanlık: MK

Veri Toplama ve/veya İşleme: MK, EP, İA

Analiz ve/veya Yorum: MK, İÇ

Makalenin Yazımı: MK, İA

Eleştirel İnceleme: MK, EP

KAYNAKLAR

- Abdullah BJ, Atasoy N, Omer AK (2019).** Evaluate the effects of platelet rich plasma (PRP) and zinc oxide ointment on skin wound healing. *Ann Med Surg*, 37, 30-37.
- Abegao KGB, Bracale BN, Delfim IG et al. (2015).** Effects of heterologous platelet-rich plasma gel on standardized dermal wound healing in rabbits. *Acta Cir Bras*, 30 (3), 209-215.
- Akbarzadeh S, McKenzie MB, Rahman M, Cleland H (2021).** Allogeneic platelet-rich plasma: is it safe and effective for wound repair? *Eur Surg Res*, 62, 1-9.
- Alkan F, Koç Y, Çelik İ, Erol M, Aydın MF (2007).** Tavşanlarda peritoneal adezyonların önlenmesinde metilprednisolon (MP) ve dimetil sülfoksit (DMSO)'ün etkilerinin araştırılması. *Vet Bil Derg*, 21 (2), 73-79.
- Altıntaş Ural D, Altıntaş Aykan D, Seyithanoğlu M et al. (2022).** Efficacy of pure olive oil and PRF in the prevention of postoperative peritoneal adhesions. *Cukurova Med J*, 47 (2), 570-579.
- Alves R, Grimalt RA (2018).** review of platelet-rich plasma: history, biology, mechanism of action, and classification. *Skin Appendage Disord*, 4 (1), 18-24.
- Arnoczky SP, Shebani-Rad S (2013).** The basic science of platelet-rich plasma (PRP): what clinicians need to know. *Sports Med Arthrosc Rev*, 21, 180-185.
- Arung W, Meyrisse M, Detry O (2011).** Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World J Gastroenterol*, 17 (41), 4545-4553.
- Belebecha V, Casagrande R, Mariana R et al. (2020).** Effect of the platelet-rich plasma covering of polypropylene mesh on oxidative stress, inflammation, and adhesions. *Int Urogynecol J*, 31, 139-147.
- Beyene RT, Kavalukas SL, Barbul A (2015).** Intra-abdominal adhesions: anatomy, physiology, pathophysiology, and treatment. *Curr Probl Surg*, 52 (7), 271-319.
- Boland GM, Weigel RJ (2006).** Formation and prevention of postoperative abdominal adhesions. *J Surg Res*, 132 (1), 3-12.
- Collins T, Alexander D, Barkatali B (2021).** Platelet-rich plasma: a narrative review. *EFORT Open Rev*, 6 (4), 225-235.
- Daradka M, Alardah MM, Ismail ZB (2019).** Effects of autologous platelet-rich plasma coated sutures on intestinal anastomotic healing in rabbits. *Heliyon*, 5 (11), e02713.
- De Pascale MR, Linda Sommese L, Casamassimi A, Napoli C (2015).** Platelet derivatives in regenerative medicine: an update. *Transfus Med Rev*, 29 (1), 52-61.
- Fresno L, Fondevila D, Bambo O (2010).** Effects of platelet-rich plasma on intestinal wound healing in pigs. *Vet J*, 185 (3), 322-327.
- Ghobrial S, Ott J, Parry JP (2023).** An overview of postoperative intraabdominal adhesions and their role on female infertility: a narrative review. *J Clin Med*, 12 (6), 1-14.
- Günay C, Sağlıyan A, Yaman İ (2005).** Ratlarda deneysel olarak oluşturulan intraabdominal adezyonların önlenmesinde aprotinin ile metilen mavisinin etkinliğinin karşılaştırılması. *FÜ Sağ Bil Derg*, 2005, 19 (1), 51-55.

- Hay WP, Mueller PO, Harmon B, Amoroso L (2001).** One percent sodium carboxymethylcellulose prevents experimentally induced abdominal adhesions in horses. *Vet Surg*, 30 (3), 223-227.
- Hooker GD, Taylor BM, Driman DK (1999).** Prevention of adhesion formation with use of sodium hyaluronate-based bioresorbable membrane in a rat model of ventral hernia repair with polypropylene mesh. a randomized, controlled study. *Surgery*, 125, 211-216.
- Karakaş DÖ, Dandin Ö, Müftüoğlu T et al. (2020).** Effect of platelet-rich plasma on postoperative peritoneal inflammation and adhesions. *Arch Med Sci*, 17 (5), 1408-1413.
- Kaya F, Kismet K, Ozer H et al. (2016).** Can platelet-rich plasma be used safely in intra-abdominal operations? *Bratisl Med J*, 117 (9), 525-529.
- Kamel RM (2010).** Prevention of postoperative peritoneal adhesions. *Eur J Obstet Gyn R B*, 150, 111-118.
- Köm M (2013).** Effect of Hyaluronic acid/carboxymethylcellulose and Flunixin Meglumine Combination on the Prevention of Postoperative Intraabdominal Adhesions (an experimental study in rabbits). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19 (4), 613-618.
- Köm M (2015).** Tavşanlarda postoperatif intraabdominal adezyonların önlenmesinde hyalüronik asit/karboksümetilselüloz bariyerlerin etkinliği. *FÜ Sağ Bil Derg*, 29 (2), 75-79.
- Le ADK, Enweze L, DeBaun MR, Drago JL (2019).** Platelet-rich plasma. *Clin Sports Med*, 38 (1), 17-44.
- Makarchian HR, Kasraianfard A, Ghaderzadeh P, Javadi SMR, Ghorbanpoor M (2017).** The effectiveness of heparin, platelet-rich plasma (PRP), and silver nanoparticles on prevention of postoperative peritoneal adhesion formation in rats. *Acta Cir Bras*, 32 (1), 22-27.
- Marques LF, Stessuk T, Camargo IC et al. (2015).** Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications. *Platelets*, 26 (2), 101-113.
- Moll HD, Schumacher J, Spano WJC (1991).** Evaluation of sodium carboxymethylcellulose for prevention of experimentally induced abdominal adhesions in ponies. *Am J Vet Res*, 52 (1), 88-91.
- Moll HD, Wolfe DF, Schumacher J, Write JC (1992).** Evaluation of sodium carboxymethylcellulose for prevention of adhesions after uterine trauma in ewes. *Am J Vet Res*, 53 (8), 1454-1456.
- Mueller POE (2002).** Advances in prevention and treatment of intra-abdominal adhesions in horses. *Clin Tech Equine Pract*, 1 (3), 163-173.
- Nair SK, Bhat IK, Aurora AL (1974).** Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Arch Surg*, 108, 849-853.
- Nikolovska B, Miladinova D, Pejкова S et al. (2021).** Platelet-rich plasma-review of literature. *Pril*, 42 (1), 127-139.
- Oneto P, Etulain J (2021).** PRP in wound healing applications. *Platelets*, 32 (2), 189-199.
- Öztaş MO, Arslan FD, Öztaş S, Diniz G, Köylüoğlu G (2019).** Effects of topical application of platelet-rich plasma on esophageal stricture and oxidative stress after caustic burn in rats: Is autologous treatment possible? *J Pediatr Surg*, 54 (7), 1397-1404.
- Schnüriger B, Barmparas G, Branco B et al (2011).** Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *Am J Surg*, 201, 111-121.
- Smith OJ, Jell G, Mosahebi A (2019).** The use of fat grafting and platelet-rich plasma for wound healing: A review of the current evidence. *Int Wound J*, 16 (1), 275-285.
- Tang J, Xiang Z, Bernardis MT, Chen S (2020).** Peritoneal adhesions: occurrence, prevention and experimental models. *Acta Biomater*, 116, 84-104.
- Trew G (2006).** Postoperative adhesions and their prevention. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice*, 6, 47-56.
- Turan E, Ayhan B, Kargin S, Doğru O, Uğraş NS (2020).** Evaluation of the efficacy of platelet-rich plasma in preventing postoperative intraabdominal adhesions. *Turk J Surg*, 36 (1), 53-58.
- Ward BC, Panintch A (2011).** Abdominal adhesions: current and novel therapies. *J Surg Res*, 165, 91-111.
- Yıldız H, Durmuş AS, Şimşek H, Yaman İ (2011).** The comparison of methylene blue and vitamin E in prevention of abdominal postoperative adhesion formation in rat uterine horn models. biochemical and histopathologic evaluation. *Acta Cir Bras*, 26 (1), 51-57.
- Yılmaz Y, Çelik İH, Pampal A (2012).** Effects of different pulmonary surfactants in the prevention of postoperative intraabdominal adhesion formation. *J Pediatr Surg*, 47, 1560-1565
- Zhang W, Guo Y, Kuss M et al. (2019).** Platelet-rich plasma for the treatment of tissue infection: preparation and clinical evaluation. *Tissue Eng Part B Rev*, 25 (3), 225-236.



An Assessment on the Experiences of Distance Education of Students at Veterinary Faculty of Ankara University

Pınar AMBARCİOĞLU¹ Aytaç ÜNSAL ADACA² *

¹Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biostatistics, 31030, Hatay, Türkiye
²Ankara University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary History and Deontology, 06110, Ankara, Türkiye

Received: 28.02.2023

Accepted: 04.01.2024

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the perspectives of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine students towards distance education. Data were collected from 591 students with a 24-question survey. According to the data, many students often encountered various technological problems and barriers due to lack of infrastructure during the courses. On the other hand, students with comfortable living environments had a more optimistic view of distance education. Having prior experience in distance education had a positive effect on the class participation rate. The frequency of participation in the courses was higher and the frequency of asking questions to the lecturers was lower in first graders. First graders mostly disagreed with the view that distance education provides effective learning or stated that they were undecided. Third and fourth year students did not consider distance education as disadvantageous. While it was seen that many students prefer face-to-face education, the presence of a group of students who want to continue distance education was also noteworthy. In conclusion, physical, technological and temporal flexibility can be seen as one of the strengths of the distance education. The difficulty of accessing the course due to the lack of technological infrastructure is seen as a major disadvantage of this method. Although it has been seen that students generally preferred face-to-face education, the existence of a group of students who wanted to continue distance education and reported that the method has some advantages is also remarkable. It can be considered that living in favorable conditions is positively related to students' ability to benefit from distance education.

Keywords: Distance, Education, Students, Veterinary education.

öz

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Öğrencilerinin Uzaktan Eğitim Deneyimleri Üzerine Bir Değerlendirme

Bu çalışma ile Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğrencilerinin uzaktan eğitime karşı bakış açılarını değerlendirmek amaçlandı. Bu amaçla 24 soruluk anket formu ile 591 öğrenciden veri toplandı. Verilere göre birçok öğrencinin dersler sırasında altyapı eksikliği nedeniyle sıklıkla çeşitli teknolojik sorunlar ve engellerle karşılaştığı belirlendi. Öte yandan, rahat bir yaşam alanı olan öğrenciler, uzaktan eğitime karşı daha iyimser bir bakış açısına sahipti. Uzaktan eğitim deneyimine sahip olmak derse katılım oranını olumlu etkiledi. Birinci sınıflarda derslere katılım sıklığı daha yüksek, öğretim elemanlarına soru sorma sıklığı ise daha düşüktü. Birinci sınıf öğrencileri çoğunlukla uzaktan eğitimin etkili öğrenme sağladığı görüşüne katılmadı veya kararsız olduklarını belirtti. Üçüncü ve dördüncü sınıf öğrencileri uzaktan eğitimi dezavantajlı olarak değerlendirmediler. Birçok öğrencinin yüz yüze eğitimi tercih ettiği görülürken, uzaktan eğitime devam etmek isteyen bir öğrenci grubunun varlığı da belirlendi. Sonuç olarak, fiziksel, teknolojik ve zamansal esneklik uzaktan eğitimin güçlü yönlerinden biri olarak görülebilir. Teknolojik alt yapı eksikliğinden dolayı derslere katılımın zor olması bu yöntem için büyük bir dezavantaj olarak görülmektedir. Öğrencilerin genel olarak yüz yüze eğitimi tercih ettiği görülse de uzaktan eğitime devam etmek isteyen ve yöntemin bazı avantajlara sahip olduğunu bildiren bir grup öğrencinin varlığı da dikkat çekicidir. Uygun koşullarda yaşamının öğrencilerin uzaktan eğitimden yararlanabilmesiyle pozitif ilişkili olduğu düşünülebilir.

Anahtar Kelimeler: Eğitim, Uzaklık, Öğrenciler, Veterinerlik eğitimi.



INTRODUCTION

Distance education (DE) is defined as a process that lecturer and the student are not in the same physical environment and education activities are continued with the help of technology. On the other hand, as a part of DE, online teaching (OT) is the process of transferring the knowledge from lecturers or sources to the students synchronously or asynchronously (Oncu and Cakir 2011). Besides, online learning (OL) is defined as access to learning experiences by means of online or technological sources (Moore et al. 2011). In the last decades, there has been an increase in the number of studies on DE, OT, OL and data related to definitions of the terms (Moore et al. 2011), curriculum changes (Sandhu and de Wolf 2020), student satisfaction (Harvey et al. 2017; Abbasi et al. 2020; Elshami et al. 2021; Kafes and Yıldırım 2021; Li et al. 2021), learning flow (Kim et al. 2021), problems related to technological infrastructure (Dost et al. 2020; Li et al. 2021; Parkes and Barrs 2021; Yeh and Tsai 2022), anxiety and stress factors (Rutkowska et al. 2021; Başağaoğlu Demirekin and Buyukcavus 2022), perspectives of lecturers and students (Abbasi et al. 2020; Di Giacomo and Di Paolo 2021).

In the field of health sciences, in addition to medicine (Dost et al. 2020; Ahmady et al. 2021), dentistry (Ertürk Avunduk and Delikan 2021; Gebril et al. 2021; Silva et al. 2021) and nursing (Kim et al. 2021), studies on distance or online teaching/learning experiences of veterinary students (Choudhary 2021; Koort and Åvall-Jääskeläinen 2021; Parkes and Barrs 2021; Mahdy and Sayed 2022) gained momentum. In Türkiye, studies on distance education in veterinary medicine started to come to the fore after the Covid-19 pandemic. In these studies, subjects such as students' coping with pandemic stress (Çelik et al. 2022), veterinary ethics in pandemic (Armutak 2021) and students' perspectives on distance education (Aslım et al. 2023) were published. In addition to these publications in the literature, the main purpose of this study is to reveal the perspectives of students on the distance education method, and distance learning experiences of students of Ankara University Faculty of Veterinary Medicine from the first to the fifth grades.

MATERIAL AND METHODS

Approval of the study was obtained from Ankara University Ethics Committee (Date: 11.10.2021 Decision No: 15/168). Keywords of the abstract of the study were chosen from "The Medical Subject Headings" (MeSH). Turkish keywords were selected from "Türkiye Bilim Terimleri (TBT) version 2.0". The selection of Turkish keywords was prepared by TBT not for the purpose of translating the words in the MeSH into Turkish, but to create a standard equivalent for these words (Türkiye Bilim Terimleri 2020). Since the keywords in the abstracts were chosen from the mentioned scientific platforms, it was necessary to use them without any changes.

Pilot Study

The pilot study was conducted between October 12 and October 15, 2021. The preliminary study was completed with a group of 30 randomly selected students from Ankara University Faculty of Veterinary Medicine (Fall Semester of the 2020-2021 Academic Year). Thanks to the pilot application, the ambiguities, question errors, and incomprehensible questions in the survey were updated and the survey (Table 1) was given its final form.

Data from the pilot study were not used in the power analysis. It was used only to check the applicability of the questionnaire, the comprehensibility of the questions, and whether the survey link works or not. Thanks to the pilot study, the mistakes in the questions and the questions that could not be understood were rearranged. At this stage, expert opinions were received on assessment and evaluation and data processing.

Design of the Study

The research has been designed as a cross-sectional study. The population of the research consists of 1494 students (258 first grade, 283 second grade, 255 third grade, 477 fourth grade, 221 fifth grade) who received distance education via online teaching model at Ankara University Faculty of Veterinary Medicine during the Covid-19 pandemic period. Sample of the study is 591 students. Since it was aimed to reach the entire population in the research, sample selection was not made. Being a student in distance education period at Ankara University Faculty of Veterinary Medicine is determined to be the only criterion for participating voluntarily in the research. The researcher who collected and analyzed the data from students is not in the institution to which the students are affiliated but in the academic staff of a different university. Considering the position of this author, it has aimed to avoid any interaction, conflict of interest, or bias between the students and the data collector. Two weeks after the questionnaire link was sent to all students, they were reminded by a reminder note to participate in the questionnaire in two weeks. At the same time, informed consent was given to the all participants. The study was terminated when all volunteers who agreed to participate in the study were reached. Research design does not require keeping the purpose of the study secret.

Data Collection Tool and Collection of Data

After a comprehensive literature review (Armstrong-Mensah et al. 2020; Can and Köroğlu 2020; Di Pietro et al. 2020; Gençoğlu and Çiftçi 2020) a questionnaire (survey) suitable for this study was created. A survey consisting of 24 questions (Table 1), which was created through Google Forms, and was finalized in the pilot study, was used as a data collection tool. All students studying at Ankara University's Faculty of Veterinary Medicine were invited to participate in the study by sending a survey participation link via their contact addresses (e-mail and phone). The data collection process took place between 18 October and 18 November 2021. Responses from students were stored anonymously in electronic media via Google Forms.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were shown as frequency and percentage for qualitative data. Pearson Chi-Square or Fisher's Exact Test was used considering the distribution of expected values to cells to compare the distributions of categorical variables between groups. All statistical analyses were performed using SPSS 14.1. The statistical significance level was considered as $p < 0.05$.

RESULTS

Among the invited students, 601 of them accessed the Survey Form via the shared link. 98.3% ($n=591$) of the students agreed to participate in the study, and 1.7% ($n=10$) did not want to be included in the study and sent the form without answering the questions. Thus, the sample of the study consisted of 591 students: 55.8% female ($n=330$) and 44.2% male ($n=261$) (Table 1). In terms of the veterinary undergraduate program language,

85.1% (n=503) of the participants were in Turkish, and 14.9% (n=88) were in the English program. 34.9% were first grade (n=206), 15.9% were second grade (n=94), 23.4% were third grade (n=138), 20.3% were fourth grade (n=120) and 5.6% were fifth (last) grade (n=33) (Table 1).

In Table 2, the survey questions were associated with the place where students live during their university education. Accordingly, it was seen that the majority of those who reported the inadequacy of the comfort and technological standards of the environment they lived in were students living in dormitories or guesthouses, and those who reported that conditions are sufficient were mostly those who stayed in family/relative house ($p<0.001$). It was observed that the frequency of asking questions to the lecturers was lower ($p=0.044$) and the technological difficulties experienced during distance education were higher ($p<0.001$) among the students living in the dormitories. The students living at the family house were least likely to reported that they never/rarely participated in the courses ($p=0.003$). Those who stated that DE did not provide effective learning were the students living in the dormitories ($p=0.021$). Again, compared to DE, those who preferred face-to-face education were students living in dormitories at a slightly higher rate ($p=0.003$). The majority of those who stated that DE has disadvantages ($p=0.030$) but not advantages ($p=0.032$) consist of students living in dormitories. Hence, more than half of the students who stated that they did not want to continue DE after resuming face-to-face education were formed by the ones living in dormitories ($p=0.004$).

In Table 3, the comfort and technological standards of the environment in which the students live and the distribution of their answers to the questions were related. Accordingly, the frequency of participation in the courses and the frequency of asking questions were higher, and the frequency of technological problems were lower for the students who stated that the environment they lived in is comfortable and have high technological standards ($p=0.004$, $p<0.001$, and $p<0.001$, respectively). Therefore, these students mostly stated that DE provides effective learning, has advantages, does not have disadvantages, and prefer DE over face-to-face education ($p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.001$, respectively). Similarly, the students in this group thought that DE is *definitely applicable* or *partially applicable* in practical courses ($p=0.001$). As a result, students who stated that the environment they lived in is comfortable and the technological standards are high, mostly stated that they wanted to continue DE after switching to face-to-face education again ($p<0.001$).

Table 4 shows the relationship between whether DE provides effective learning and the other answers of the students. Accordingly, students who thought that DE did not provide effective learning stated that the comfort of the environment they lived in was inadequate, and the frequency of participation in the courses and asking questions was less ($p<0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, respectively). These students also stated that the effectiveness of the course duration was less, and they experienced more technological problems during the courses ($p<0.001$). Based on these data, students who thought that DE did not provide effective learning mostly preferred face-to-face education and stated that it was not appropriate to use DE in practical courses ($p<0.001$). It was observed that almost all of these students thought that DE was not advantageous but disadvantageous ($p<0.001$, $p<0.001$, respectively). Similarly, students in this group reported negative opinions about the safety of remote

exams ($p<0.001$). As a result, they mostly did not want to continue DE after switching to face-to-face education ($p<0.001$).

In Table 5, students' preferences between DE and face-to-face education were examined. Correspondingly, although face-to-face education is mostly preferred, it was seen that the rate of preference for DE was slightly higher ($p<0.001$) and the frequency of participation in distance courses was higher ($p=0.036$) for students whose environment was comfortable. It was observed that the students who preferred face-to-face education asked the lecturers fewer questions during the online courses ($p<0.001$). In addition, students who had technological problems during DE preferred face-to-face education ($p<0.001$). Accordingly, students who preferred face-to-face education mostly reported that DE did not provide effective learning and was disadvantageous ($p<0.001$ and $p<0.001$). In parallel, the group preferring face-to-face education reported that DE should not be used in applied courses, exams of the DE courses should be face-to-face, and online exams were not held securely ($p<0.001$, $p=0.005$ and $p<0.001$, respectively). Unsurprisingly, students who preferred face-to-face education stated that they did not or sometimes wanted to continue DE in the future ($p<0.001$).

In Table 6, the distribution of the answers given by the students to the survey is correlated with the grade they are enrolled in. According to Table 6, the frequency of participation in the courses is higher and the frequency of asking questions to the lecturers is lower in first graders ($p<0.001$ and $p=0.008$, respectively). Among all grades, first graders are less likely to attend courses due to technological glitches ($p<0.001$). First graders mostly disagree with the view that DE provides effective learning or state that they are undecided ($p<0.001$).

Accordingly, they mostly prefer the face-to-face education method, reporting that DE has advantages as well as disadvantages ($p<0.001$, $p=0.001$, $p<0.001$, respectively). On the other hand, third and fourth graders state that DE is not disadvantageous. Similarly, first graders view the use of DE in applied courses negatively, while third and fourth graders view it positively ($p=0.018$). It is mostly the first and third graders who want the exams of the DE courses to be online and the rate of undecided freshmen is quite high ($p=0.002$). Similarly, first-year students report that distance exams are not safe and consist the majority group among undecided participants ($p<0.001$). Parallel to these results, first graders mostly do not or sometimes want to continue DE, and fourth graders mostly want continue DE after resuming face-to-face education ($p<0.001$).

Table 7 showed the relationship between veterinary students' experience of DE prior to the COVID-19 pandemic and their answers to the survey questions. Accordingly, the frequency of asking questions during the courses of the students who received DE before the pandemic was higher than those who did not ($p=0.005$). In addition, students with DE experience stated that they encountered fewer technological difficulties during the courses compared to those who did not have DE experience ($p=0.021$). The majority of the students without DE experience stated that DE did not provide effective learning ($p=0.005$), and they preferred face-to-face education over DE ($p=0.019$). Accordingly, the students who thought that DE is disadvantageous were those who had no previous experience in DE ($p<0.001$). In addition, those who stated that DE should not be applied in applied courses or that it is partially applicable were also students who did not have prior DE experience ($p=0.007$).

Table 1: Frequency and percentage of all questions in the survey.

Questions	n (%)		
Gender		Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	
<i>Female</i>	330 (55.8)	<i>Never</i>	28 (4.7)
<i>Male</i>	261 (44.2)	<i>Rarely</i>	100 (16.9)
Which undergraduate program are you enrolled in veterinary school?		<i>Sometimes</i>	227 (38.4)
<i>Turkish undergraduate program</i>	503 (85.1)	<i>Often</i>	171 (28.9)
<i>English undergraduate program</i>	88 (14.9)	<i>Always</i>	65 (11.0)
Grade		Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	
<i>1</i>	206 (34.9)	<i>Yes</i>	344 (58.2)
<i>2</i>	94 (15.9)	<i>No</i>	247 (41.8)
<i>3</i>	138 (23.4)	Do you think distance education provides effective learning?	
<i>4</i>	120 (20.3)	<i>Yes</i>	121 (20.5)
<i>5</i>	33 (5.6)	<i>No</i>	327 (55.3)
Where do you currently live for your university education?		<i>Undecided</i>	143 (24.2)
<i>Family / relative house</i>	177 (29.9)	How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	
<i>Student house</i>	164 (27.7)	<i>Never</i>	54 (9.1)
<i>Dormitory/guesthouse etc.</i>	250 (42.3)	<i>1 time</i>	222 (37.6)
Did you receive online/distance education before the Covid-19 pandemic?		<i>2 times</i>	176 (29.8)
<i>Yes</i>	207 (35.0)	<i>3 times</i>	79 (13.4)
<i>No</i>	384 (65.0)	<i>4 times</i>	11 (1.9)
Do you think you have the technological knowledge required for distance education?		<i>5 times or more</i>	49 (8.3)
<i>Yes</i>	389 (65.8)	When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?	
<i>No</i>	38 (6.4)	<i>Face-to-face education method</i>	408 (69.0)
<i>Partially</i>	164 (27.7)	<i>Online learning method</i>	112 (19.0)
What devices do you use in distance education?		<i>Undecided</i>	71 (12.0)
<i>Personal computer</i>	517 (87.5)	Do you think distance education has some advantages?	
<i>Personal phone</i>	448 (75.8)	<i>Yes</i>	403 (68.2)
<i>Personal tablet</i>	81 (13.7)	<i>No</i>	121 (20.5)
<i>Someone else's/public computer</i>	94 (15.9)	<i>Undecided</i>	67 (11.3)
<i>Someone else's/public phone</i>	17 (2.9)	Do you think distance education has some disadvantages?	
<i>Someone else's/public tablet</i>	10 (1.7)	<i>Yes</i>	515 (87.1)
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?		<i>No</i>	44 (7.4)
<i>Very inadequate</i>	32 (5.4)	<i>Undecided</i>	32 (5.4)
<i>Inadequate</i>	88 (14.9)	How would you evaluate the use of distance education in practical courses?	
<i>Average</i>	209 (35.4)	<i>Definitely applicable</i>	41 (6.9)
<i>Adequate</i>	178 (30.1)	<i>Definitely not applicable</i>	399 (67.5)
<i>Very adequate</i>	84 (14.2)	<i>Partially applicable</i>	141 (23.9)
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the online course?		<i>Undecided</i>	10 (1.7)
<i>Never</i>	6 (1.0)	Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	
<i>Rarely</i>	40 (6.8)	<i>Face-to-face assessment</i>	81 (13.7)
<i>Sometimes</i>	95 (16.1)	<i>Online assessment</i>	468 (79.2)
<i>Often</i>	282 (47.7)	<i>Undecided</i>	42 (7.1)
<i>Always</i>	168 (28.4)	Which assessment method do you prefer in distance education?	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the online course?		<i>Open-ended questions exam</i>	21 (3.6)
<i>Never</i>	107 (18.1)	<i>Multiple choice exam</i>	312 (52.8)
<i>Rarely</i>	257 (43.5)	<i>Oral exam</i>	2 (0.3)
<i>Sometimes</i>	164 (27.7)	<i>Homework presentation</i>	140 (23.7)
<i>Often</i>	41 (6.9)	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	116 (19.6)
<i>Always</i>	22 (3.7)	Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the online course?		<i>Yes</i>	161 (27.2)
<i>Never</i>	9 (1.5)	<i>No</i>	283 (47.9)
<i>Rarely</i>	148 (25.0)	<i>Partially</i>	147 (24.9)
<i>Sometimes</i>	301 (50.9)	Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	
<i>Often</i>	110 (18.6)	<i>Yes</i>	138 (23.4)
<i>Always</i>	23 (3.9)	<i>No</i>	204 (34.5)
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?		<i>Sometimes</i>	231 (39.1)
<i>Never</i>	42 (7.1)	<i>Undecided</i>	18 (3.0)
<i>Rarely</i>	93 (15.7)		
<i>Sometimes</i>	160 (27.1)		
<i>Often</i>	236 (39.9)		
<i>Always</i>	60 (10.2)		

Table 2: Distribution of answers to living places.

		Where do you currently live for your university education?			p
		Family/ relative house	Student house	Dormitory/ guesthouse etc.	
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following online learning?	<i>Very inadequate / Inadequate</i>	18 (15.0)	18 (15.0)	84 (70.0)	<0.001¹
	<i>Average</i>	56 (26.8)	48 (23.0)	105 (50.2)	
	<i>Adequate/ Very adequate</i>	103 (39.3)	98 (37.4)	61 (23.3)	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	7 (15.2)	18 (39.1)	21 (45.7)	0.003¹
	<i>Sometimes</i>	24 (25.3)	38 (40.0)	33 (34.7)	
	<i>Often / Always</i>	146 (32.4)	108 (24.0)	196 (43.6)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	98 (26.9)	99 (27.2)	17 (45.9)	0.044¹
	<i>Sometimes</i>	56 (34.1)	42 (25.6)	66 (40.2)	
	<i>Often / Always</i>	23 (36.5)	23 (36.5)	17 (27.0)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	40 (25.5)	40 (25.5)	77 (49.0)	0.026¹
	<i>Sometimes</i>	97 (32.2)	75 (24.9)	129 (42.9)	
	<i>Often / Always</i>	40 (30.1)	49 (36.8)	44 (33.1)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	49 (36.3)	34 (25.2)	52 (38.5)	0.233 ¹
	<i>Sometimes</i>	38 (23.8)	49 (30.6)	73 (45.6)	
	<i>Often / Always</i>	90 (30.4)	81 (27.4)	125 (42.2)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	56 (43.8)	43 (33.6)	29 (22.7)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	67 (29.5)	65 (28.6)	95 (41.9)	
	<i>Often / Always</i>	54 (22.9)	56 (23.7)	126 (53.4)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	<i>Yes</i>	102 (29.7)	109 (31.7)	133 (38.7)	0.027¹
	<i>No</i>	75 (30.4)	55 (22.3)	117 (47.4)	
Do you think distance education provides effective learning?	<i>Yes</i>	39 (32.2)	41 (33.9)	41 (33.9)	0.021¹
	<i>No</i>	88 (26.9)	81 (24.8)	158 (48.3)	
	<i>Undecided</i>	50 (35.0)	42 (29.4)	51 (35.7)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	<i>Never</i>	18 (33.3)	17 (31.5)	19 (35.2)	0.166 ²
	<i>1 time</i>	58 (26.1)	55 (24.8)	109 (49.1)	
	<i>2 times</i>	56 (31.8)	49 (27.8)	71 (40.3)	
	<i>3 times</i>	25 (31.6)	20 (25.3)	34 (43.0)	
	<i>4 times</i>	5 (45.5)	2 (18.2)	4 (36.4)	
When you compare online learning and face-to-face education methods, which one do you prefer?	<i>5 times or more</i>	15 (30.6)	21 (42.9)	13 (26.5)	0.003¹
	<i>Face-to-face education</i>	117 (28.7)	98 (24.0)	193 (47.3)	
<i>Online learning</i>	37 (33.0)	43 (38.4)	32 (28.6)		
<i>Undecided</i>	23 (32.4)	23 (32.4)	25 (35.2)		

Table 2 (continued): Distribution of answers to living places.

Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	129 (32.0)	120 (29.8)	154 (38.2)	0.032¹
	<i>No</i>	27 (22.3)	31 (25.6)	63 (52.1)	
	<i>Undecided</i>	21 (31.3)	13 (19.4)	33 (49.3)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	156 (30.3)	134 (26.0)	225 (43.7)	0.030¹
	<i>No</i>	8 (18.2)	19 (43.2)	17 (38.6)	
	<i>Undecided</i>	13 (40.6)	11 (34.4)	8 (25.0)	
How would you evaluate the use of distance education in practical courses?	<i>Definitely applicable</i>	11 (26.8)	14 (34.1)	16 (39.0)	0.646 ²
	<i>Definitely not applicable</i>	117 (29.3)	104 (26.1)	178 (44.6)	
	<i>Partially applicable</i>	45 (31.9)	44 (31.2)	52 (36.9)	
	<i>Undecided</i>	4 (40.0)	2 (20.0)	4 (40.0)	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	26 (32.1)	14 (17.3)	41 (50.6)	0.114 ¹
	<i>Online assessment</i>	142 (30.3)	136 (29.1)	190 (40.6)	
	<i>Undecided</i>	9 (21.4)	14 (33.3)	19 (45.2)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Open-ended questions exam</i>	2 (9.5)	4 (19.0)	15 (71.4)	<0.001²
	<i>Multiple choice exam</i>	97 (31.1)	68 (21.8)	147 (47.1)	
	<i>Oral exam</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	-	
	<i>Homework presentation</i>	35 (25.0)	60 (42.9)	45 (32.1)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	42 (36.2)	31 (26.7)	43 (37.1)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>Yes</i>	43 (26.7)	51 (31.7)	67 (41.6)	0.726 ¹
	<i>No</i>	88 (31.1)	75 (26.5)	120 (42.4)	
	<i>Undecided</i>	46 (31.3)	38 (25.9)	63 (42.9)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>Yes</i>	49 (35.5)	46 (33.3)	43 (31.2)	0.004²
	<i>No</i>	51 (25.0)	45 (22.1)	108 (52.9)	
	<i>Sometimes</i>	71 (30.7)	70 (30.3)	80 (39.0)	
	<i>Undecided</i>	6 (33.3)	3 (16.7)	9 (50.0)	

¹: Pearson Chi-Square²: Fisher's Exact Test

Table 3: Distribution of answers to technological infrastructure and comfort.

		How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?			p
		Very inadequate/ inadequate	Average	Adequate/ Very adequate	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	10 (21.7)	17 (37.0)	19 (41.3)	0.004¹
	<i>Sometimes</i>	29 (30.5)	40 (42.1)	26 (27.4)	
	<i>Often / Always</i>	81 (18.0)	152 (33.8)	217 (48.2)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	84 (23.1)	143 (39.3)	137 (37.6)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	30 (18.3)	56 (34.1)	78 (47.6)	
	<i>Often / Always</i>	6 (9.5)	10 (15.9)	47 (74.6)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	44 (28.0)	69 (43.9)	44 (28.0)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	61 (20.3)	102 (33.9)	138 (45.8)	
	<i>Often / Always</i>	15 (11.3)	38 (28.6)	80 (60.2)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	37 (27.4)	56 (41.5)	42 (31.1)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	41 (25.6)	64 (40.0)	55 (34.4)	
	<i>Often / Always</i>	42 (14.2)	89 (30.1)	165 (55.7)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	5 (3.9)	13 (10.2)	110 (85.9)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	22 (9.7)	93 (41.0)	112 (49.3)	
	<i>Often / Always</i>	93 (39.4)	103 (43.6)	40 (16.9)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/ technical difficulties?	<i>Yes</i>	80 (23.3)	129 (37.5)	135 (39.2)	0.009¹
	<i>No</i>	40 (16.2)	80 (32.4)	127 (51.4)	
Do you think distance education provides effective learning?	<i>Yes</i>	11 (9.1)	19 (15.7)	91 (75.2)	<0.001¹
	<i>No</i>	94 (28.7)	127 (38.8)	106 (32.4)	
	<i>Undecided</i>	15 (10.5)	63 (44.1)	65 (45.5)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	<i>Never</i>	20 (37.0)	12 (22.2)	22 (40.7)	<0.001²
	<i>1 time</i>	51 (23.0)	84 (37.8)	87 (39.2)	
	<i>2 times</i>	31 (17.6)	64 (36.4)	81 (46.0)	
	<i>3 times</i>	10 (12.7)	33 (41.8)	36 (45.6)	
	<i>4 times</i>	3 (27.3)	1 (9.1)	7 (63.6)	
	<i>5 times or more</i>	5 (10.2)	15 (30.6)	29 (59.2)	

Table 3 (continued): Distribution of answers to technological infrastructure and comfort.

When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?	<i>Face-to-face education method</i>	100 (24.5)	161 (39.5)	147 (36.0)	<0.001¹
	<i>Online learning method</i>	8 (7.1)	20 (17.9)	84 (75.0)	
	<i>Undecided</i>	12 (16.9)	28 (39.4)	31 (43.7)	
Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	63 (15.6)	130 (32.3)	210 (52.1)	<0.001¹
	<i>No</i>	44 (36.4)	45 (37.2)	32 (26.4)	
	<i>Undecided</i>	13 (19.4)	34 (50.7)	20 (29.9)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	113 (21.9)	197 (38.3)	205 (39.8)	<0.001¹
	<i>No</i>	4 (9.1)	6 (13.6)	34 (77.3)	
	<i>Undecided</i>	3 (9.4)	6 (18.8)	23 (71.9)	
How would you evaluate the use of distance education in practical courses?	<i>Definitely applicable</i>	8 (19.5)	5 (12.2)	28 (68.3)	0.001²
	<i>Definitely not applicable</i>	90 (22.6)	154 (38.6)	155 (38.8)	
	<i>Partially applicable</i>	21 (14.9)	43 (30.5)	77 (54.6)	
	<i>Undecided</i>	1 (10.0)	7 (70.0)	2 (20.0)	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	17 (21.0)	37 (45.7)	27 (33.3)	0.006¹
	<i>Online assessment</i>	98 (20.9)	149 (31.8)	221 (47.2)	
	<i>Undecided</i>	5 (11.9)	23 (54.8)	14 (33.3)	
	<i>Open-ended questions exam</i>	9 (42.9)	8 (38.1)	4 (19.0)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Multiple choice exam</i>	63 (20.2)	97 (31.1)	152 (48.7)	0.003²
	<i>Oral exam</i>	-	-	2 (100.0)	
	<i>Homework presentation</i>	34 (24.3)	51 (36.4)	55 (39.3)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	14 (12.1)	53 (45.7)	49 (42.2)	
	<i>Yes</i>	34 (21.1)	41 (25.5)	86 (53.4)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>No</i>	61 (21.6)	110 (38.9)	112 (39.6)	<0.001¹
	<i>Undecided</i>	25 (17.0)	58 (39.5)	64 (43.5)	
	<i>Yes</i>	14 (10.1)	27 (19.6)	97 (70.3)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>No</i>	67 (32.8)	83 (40.7)	54 (26.5)	<0.001²
	<i>Sometimes</i>	34 (14.7)	91 (39.4)	106 (45.9)	
	<i>Undecided</i>	5 (27.8)	8 (44.4)	5 (27.8)	
	<i>Yes</i>	14 (10.1)	27 (19.6)	97 (70.3)	

¹: Pearson Chi-Square²: Fisher's Exact Test

Table 4: Distribution of answers to effectiveness of distance education.

		Do you think distance education provides effective learning?			P
		Yes	No	Undecided	
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?	<i>Very inadequate / Inadequate</i>	11 (9.2)	94 (78.3)	15 (12.5)	<0.001¹
	<i>Average</i>	19 (9.1)	127 (60.8)	63 (30.1)	
	<i>Adequate/ Very adequate</i>	91 (34.7)	106 (40.5)	65 (24.8)	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	3 (6.5)	34 (73.9)	9 (19.6)	0.001¹
	<i>Sometimes</i>	9 (9.5)	63 (66.3)	23 (24.2)	
	<i>Often / Always</i>	109 (24.2)	230 (51.1)	111 (24.7)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	36 (9.9)	249 (68.4)	79 (21.7)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	44 (26.8)	69 (42.1)	51 (31.1)	
	<i>Often / Always</i>	41 (65.1)	9 (14.3)	13 (20.6)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	14 (8.9)	116 (73.9)	27 (17.2)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	51 (16.9)	165 (54.8)	85 (28.2)	
	<i>Often / Always</i>	56 (42.1)	46 (34.6)	31 (23.3)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	5 (3.7)	108 (80.0)	22 (16.3)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	12 (7.5)	106 (66.3)	42 (26.3)	
	<i>Often / Always</i>	104 (35.1)	113 (38.2)	79 (26.7)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	59 (46.1)	40 (31.3)	29 (22.7)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	44 (19.4)	116 (51.1)	67 (29.5)	
	<i>Often / Always</i>	18 (7.6)	171 (72.5)	47 (19.9)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	<i>Yes</i>	51 (14.8)	208 (60.5)	85 (24.7)	<0.001¹
	<i>No</i>	70 (28.3)	119 (48.2)	58 (23.5)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	<i>Never</i>	7 (13.0)	41 (75.9)	6 (11.1)	<0.001²
	<i>1 time</i>	31 (14.0)	139 (62.6)	52 (23.4)	
	<i>2 times</i>	35 (19.9)	85 (48.3)	56 (31.8)	
	<i>3 times</i>	19 (24.1)	41 (51.9)	19 (24.1)	
	<i>4 times</i>	5 (45.5)	3 (27.3)	3 (27.3)	
	<i>5 times or more</i>	24 (49.0)	3 (36.7)	7 (14.3)	

Table 4 (continued): Distribution of answers to effectiveness of distance education.

When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?	<i>Face-to-face education method</i>	14 (3.4)	306 (75.0)	88 (21.6)	<0.001¹
	<i>Online learning method</i>	88 (78.6)	2 (1.8)	22 (19.6)	
	<i>Undecided</i>	19 (26.8)	19 (26.8)	33 (46.5)	
Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	120 (29.8)	161 (40.0)	122 (30.3)	<0.001²
	<i>No</i>	-	114 (94.2)	7 (5.8)	
	<i>Undecided</i>	1 (1.5)	52 (77.6)	14 (20.9)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	60 (11.7)	321 (62.3)	134 (26.0)	<0.001²
	<i>No</i>	41 (93.2)	3 (6.8)	-	
	<i>Undecided</i>	20 (62.5)	3 (9.4)	9 (28.1)	
How would you evaluate the use of distance education in practical courses?	<i>Definitely applicable</i>	34 (82.9)	6 (14.6)	1 (2.4)	<0.001²
	<i>Definitely not applicable</i>	35 (8.8)	275 (68.9)	89 (22.3)	
	<i>Partially applicable</i>	47 (33.3)	43 (30.5)	51 (36.2)	
	<i>Undecided</i>	5 (50.0)	3 (30.0)	2 (20.0)	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	12 (14.8)	50 (61.7)	19 (23.5)	0.172 ¹
	<i>Online assessment</i>	105 (22.4)	252 (53.8)	111 (23.7)	
	<i>Undecided</i>	4 (9.5)	25 (59.5)	13 (31.0)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Open-ended questions exam</i>	3 (14.3)	16 (76.2)	2 (9.5)	0.191 ²
	<i>Multiple choice exam</i>	73 (23.4)	166 (53.2)	73 (23.4)	
	<i>Oral exam</i>	1 (50.0)	-	1 (50.0)	
	<i>Homework presentation</i>	26 (18.6)	78 (55.7)	36 (25.7)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	18 (15.5)	67 (57.8)	31 (26.7)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>Yes</i>	69 (42.9)	66 (41.0)	26 (16.1)	<0.001¹
	<i>No</i>	25 (8.8)	197 (69.6)	61 (21.6)	
	<i>Undecided</i>	27 (18.4)	64 (43.5)	56 (38.1)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>Yes</i>	95 (68.8)	17 (12.3)	26 (18.8)	<0.001²
	<i>No</i>	5 (2.5)	175 (85.8)	24 (11.8)	
	<i>Sometimes</i>	20 (8.7)	123 (53.2)	88 (38.1)	
	<i>Undecided</i>	1 (5.6)	12 (66.7)	5 (27.8)	

¹: Pearson Chi-Square, ²: Fisher's Exact Test.

Table 5: Distribution of answers to the comparison of distance education and face-to-face education.

		When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?			p
		Face-to-face education	Distance education	Undecided	
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?	<i>Very inadequate / Inadequate</i>	100 (83.3)	8 (6.7)	12 (10.0)	<0.001¹
	<i>Average</i>	161 (77.0)	20 (9.6)	28 (13.4)	
	<i>Adequate/ Very adequate</i>	147 (56.1)	84 (32.1)	31 (11.8)	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	34 (73.9)	5 (10.9)	7 (15.2)	0.036¹
	<i>Sometimes</i>	72 (75.8)	9 (9.5)	7 (15.2)	
	<i>Often / Always</i>	302 (67.1)	98 (21.8)	50 (11.1)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	287 (78.8)	30 (8.2)	47 (12.9)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	103 (62.8)	44 (26.8)	17 (10.4)	
	<i>Often / Always</i>	18 (28.6)	38 (60.3)	7 (11.1)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the online course?	<i>Never/ Rarely</i>	130 (82.8)	11 (7.0)	16 (10.2)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	214 (71.1)	48 (15.9)	39 (13.0)	
	<i>Often / Always</i>	64 (48.1)	53 (39.8)	16 (12.0)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	118 (87.4)	5 (3.7)	12 (8.9)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	131 (81.9)	9 (5.6)	20 (12.5)	
	<i>Often / Always</i>	159 (53.7)	98 (33.1)	39 (13.2)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	61 (47.7)	56 (43.8)	11 (8.6)	<0.001¹
	<i>Sometimes</i>	156 (68.7)	36 (15.9)	35 (15.4)	
	<i>Often / Always</i>	191 (80.9)	20 (8.5)	25 (10.6)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	<i>Yes</i>	253 (73.5)	43 (12.5)	48 (14.0)	<0.001¹
	<i>No</i>	155 (62.8)	69 (27.9)	23 (9.3)	
Do you think distance education provides effective learning?	<i>Yes</i>	14 (11.6)	88 (72.7)	19 (15.7)	<0.001¹
	<i>No</i>	306 (93.6)	2 (0.6)	19 (5.8)	
	<i>Undecided</i>	88 (61.5)	22 (15.4)	33 (23.1)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	<i>Never</i>	46 (85.2)	4 (7.4)	4 (7.4)	<0.001²
	<i>1 time</i>	171 (77.0)	21 (9.5)	30 (13.5)	
	<i>2 times</i>	118 (67.0)	37 (21.0)	21 (11.9)	
	<i>3 times</i>	46 (58.2)	24 (30.4)	9 (11.4)	
	<i>4 times</i>	6 (54.5)	4 (36.4)	1 (9.1)	
	<i>5 times or more</i>	21 (42.9)	22 (44.9)	1 (9.1)	

Table 5 (continued): Distribution of answers to the comparison of distance education and face-to-face education.

Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	224 (55.6)	111 (27.5)	68 (16.9)	<0.001²
	<i>No</i>	119 (98.3)	-	2 (1.7)	
	<i>Undecided</i>	65 (97.0)	1 (1.5)	1 (1.5)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	396 (76.9)	54 (10.5)	65 (12.6)	<0.001²
	<i>No</i>	3 (6.8)	40 (90.9)	1 (2.3)	
	<i>Undecided</i>	9 (28.1)	18 (56.3)	5 (15.6)	
How would you evaluate the use of distance education in practical courses?	<i>Definitely applicable</i>	6 (14.6)	31 (75.6)	4 (9.8)	<0.001¹
	<i>Definitely not applicable</i>	338 (84.7)	28 (7.0)	33 (8.3)	
	<i>Partially applicable</i>	62 (44.0)	49 (34.8)	30 (21.3)	
	<i>Undecided</i>	2 (20.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	67 (82.7)	7 (8.6)	7 (8.6)	0.005¹
	<i>Online assessment</i>	312 (66.7)	101 (21.6)	55 (11.8)	
	<i>Undecided</i>	29 (69.0)	4 (9.5)	9 (21.4)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Open-ended questions exam</i>	17 (81.0)	1 (4.8)	3 (14.39)	0.391²
	<i>Multiple choice exam</i>	205 (65.7)	68 (21.8)	39 (12.5)	
	<i>Oral exam</i>	1 (50.0)	1 (50.0)	-	
	<i>Homework presentation</i>	99 (70.7)	24 (17.1)	17 (12.1)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	86 (74.1)	18 (15.5)	12 (10.3)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>Yes</i>	75 (46.6)	64 (39.8)	22 (13.7)	<0.001¹
	<i>No</i>	235 (83.0)	23 (8.1)	25 (8.8)	
	<i>Undecided</i>	98 (66.7)	25 (17.0)	24 (16.3)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>Yes</i>	24 (17.4)	90 (65.2)	24 (17.4)	<0.001²
	<i>No</i>	201 (98.5)	1 (0.5)	2 (1.0)	
	<i>Sometimes</i>	169 (73.2)	20 (8.7)	42 (18.29)	
	<i>Undecided</i>	14 (77.8)	1 (5.6)	3 (16.7)	

¹: Pearson Chi-Square²: Fisher's Exact Test

Table 6: Distribution of answers to academic grades.

		Academic grades					p
		1	2	3	4	5	
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?	Very inadequate / Inadequate	49 (40.8)	14 (11.7)	32 (26.7)	20 (16.7)	5 (4.2)	0.191 ¹
	Average	79 (37.8)	35 (16.7)	48 (23.0)	38 (18.2)	9 (4.3)	
	Adequate/ Very adequate	78 (29.8)	45 (17.2)	58 (22.1)	62 (23.7)	19 (7.3)	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the distance education course?	Never/ Rarely	9 (19.6)	8 (17.4)	12 (26.1)	7 (15.2)	10 (21.7)	<0.001 ²
	Sometimes	23 (24.2)	12 (12.6)	22 (23.2)	26 (27.4)	12 (12.6)	
	Often / Always	174 (38.7)	74 (16.4)	104 (23.1)	87 (19.3)	11 (2.4)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the distance course?	Never/ Rarely	136 (37.4)	60 (16.5)	83 (22.8)	67 (18.4)	18 (4.9)	0.008 ²
	Sometimes	62 (37.8)	21 (12.8)	34 (20.7)	36 (22.0)	11 (6.7)	
	Often / Always	8 (12.7)	13 (20.6)	21 (33.3)	17 (27.0)	4 (6.3)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the distance course?	Never/ Rarely	65 (41.1)	22 (14.0)	31 (19.7)	30 (19.1)	9 (5.7)	0.173 ¹
	Sometimes	105 (34.9)	54 (17.9)	67 (22.3)	57 (18.9)	18 (6.0)	
	Often / Always	36 (27.1)	18 (13.5)	40 (30.1)	33 (24.8)	6 (4.5)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	Never/ Rarely	46 (34.1)	17 (12.6)	32 (23.7)	29 (21.5)	11 (8.1)	0.245 ¹
	Sometimes	64 (40.0)	28 (17.5)	31 (19.4)	26 (16.3)	11 (6.9)	
	Often / Always	96 (32.4)	49 (16.6)	75 (25.3)	65 (22.0)	11 (3.7)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	Never/ Rarely	41 (32.0)	18 (14.1)	32 (25.0)	31 (24.2)	6 (4.7)	0.524 ¹
	Sometimes	82 (36.1)	34 (15.0)	47 (20.7)	52 (22.9)	12 (5.3)	
	Often / Always	83 (35.2)	42 (17.8)	59 (25.0)	37 (15.7)	15 (6.4)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	Yes	92 (26.7)	54 (15.7)	92 (26.7)	81 (23.5)	25 (7.3)	<0.001 ¹
	No	114 (46.2)	40 (16.2)	46 (18.6)	39 (15.8)	8 (3.2)	
Do you think distance education provides effective learning?	Yes	22 (18.2)	28 (23.1)	32 (26.4)	36 (29.8)	3 (2.5)	<0.001 ¹
	No	139 (42.5)	44 (13.5)	70 (21.4)	53 (16.2)	21 (6.4)	
	Undecided	45 (31.5)	22 (15.4)	36 (25.2)	31 (21.7)	9 (6.3)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	Never	19 (35.2)	5 (9.3)	15 (27.8)	14 (25.9)	1 (1.9)	0.041 ²
	1 time	93 (41.9)	35 (15.8)	40 (18.0)	44 (19.8)	10 (4.5)	
	2 times	57 (32.4)	24 (13.6)	52 (29.5)	33 (18.8)	10 (5.7)	
	3 times	23 (29.1)	17 (21.5)	17 (21.5)	15 (19.0)	7 (8.9)	
	4 times	2 (18.2)	6 (54.5)	2 (18.2)	1 (9.1)	-	
	5 times or more	12 (24.5)	7 (14.3)	12 (24.5)	13 (26.5)	5 (10.2)	

Table 6 (continued): Distribution of answers to academic grades.

When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?	<i>Face-to-face education method</i>	167 (40.9)	62 (15.2)	87 (21.3)	70 (17.2)	22 (5.4)	<0.001²
	<i>Distance education method</i>	18 (16.1)	18 (16.1)	33 (29.5)	37 (33.0)	6 (5.4)	
	<i>Undecided</i>	21 (29.6)	14 (19.7)	18 (25.4)	113 (18.3)	5 (7.0)	
Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	113 (28.0)	72 (17.9)	104 (25.8)	91 (22.6)	23 (5.7)	0.001²
	<i>No</i>	59 (48.8)	12 (9.9)	22 (18.2)	21 (17.4)	7 (5.8)	
	<i>Undecided</i>	34 (50.7)	10 (14.9)	12 (17.9)	8 (11.9)	3 (4.5)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	195 (37.9)	80 (15.5)	110 (21.4)	98 (19.0)	32 (6.2)	<0.001²
	<i>No</i>	6 (13.6)	6 (13.6)	15 (34.1)	16 (36.4)	1 (2.3)	
	<i>Undecided</i>	5 (15.6)	8 (25.0)	13 (40.6)	6 (18.8)	-	
How would you evaluate the use of distance education in applied courses?	<i>Definitely applicable</i>	7 (17.1)	6 (14.6)	11 (26.8)	16 (39.0)	1 (2.4)	0.018²
	<i>Definitely not applicable</i>	158 (39.6)	63 (15.8)	84 (21.1)	72 (18.0)	22 (5.5)	
	<i>Partially applicable</i>	36 (25.5)	24 (17.0)	40 (28.4)	31 (22.0)	10 (7.1)	
	<i>Undecided</i>	5 (50.0)	1 (10.0)	3 (30.0)	1 (10.0)	-	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	31 (38.3)	8 (9.9)	11 (13.6)	20 (24.7)	11 (13.6)	0.002²
	<i>Online assessment</i>	156 (33.3)	81 (17.3)	120 (25.6)	94 (20.1)	17 (3.6)	
	<i>Undecided</i>	19 (45.2)	5 (11.9)	7 (16.7)	6 (14.3)	5 (11.9)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Open-ended questions exam</i>	5 (23.8)	7 (33.3)	5 (23.8)	3 (14.3)	1 (4.8)	0.001²
	<i>Multiple choice exam</i>	123 (39.4)	51 (16.3)	73 (23.4)	58 (18.6)	7 (2.2)	
	<i>Oral exam</i>	-	-	-	-	2 (100.0)	
	<i>Homework presentation</i>	41 (29.3)	18 (12.9)	33 (23.6)	38 (27.1)	10 (7.1)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	37 (31.9)	18 (15.5)	27 (23.3)	21 (18.1)	13 (11.2)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>Yes</i>	54 (33.5)	25 (15.5)	48 (29.8)	34 (21.1)	-	<0.001²
	<i>No</i>	89 (31.4)	44 (15.5)	59 (20.8)	62 (21.9)	29 (10.2)	
	<i>Undecided</i>	63 (42.9)	25 (17.0)	31 (21.1)	24 (16.3)	4 (2.7)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>Yes</i>	23 (16.7)	27 (19.6)	38 (27.5)	46 (33.3)	4 (2.9)	<0.001²
	<i>No</i>	84 (41.2)	28 (13.7)	41 (20.1)	39 (19.1)	12 (5.9)	
	<i>Sometimes</i>	93 (40.3)	35 (15.2)	57 (24.7)	31 (13.4)	15 (6.5)	
	<i>Undecided</i>	6 (33.3)	4 (22.2)	2 (11.1)	4 (22.2)	2 (11.1)	

1: Pearson Chi-Square, 2: Fisher's Exact Test

Table 7: Distribution of answers to prior experience of distance education.

		Did you receive online/distance education before the COVID-19 pandemic?		p
		Yes	No	
How would you evaluate the comfort and technological standards of your living environment in terms of following distance education?	<i>Very inadequate / Inadequate</i>	37 (30.8)	83 (69.2)	0.047¹
	<i>Average</i>	64 (30.6)	145 (69.4)	
	<i>Adequate/ Very adequate</i>	106 (40.5)	156 (59.5)	
How would you evaluate the frequency of your instant/online participation in the distance education course?	<i>Never/ Rarely</i>	17 (37.0)	29 (63.0)	0.846 ¹
	<i>Sometimes</i>	31 (32.6)	64 (67.4)	
	<i>Often / Always</i>	159 (35.3)	291 (64.7)	
How would you evaluate the frequency of asking questions to the lecturer during the distance course?	<i>Never/ Rarely</i>	112 (30.8)	252 (69.2)	0.005¹
	<i>Sometimes</i>	63 (38.4)	101 (61.6)	
	<i>Often / Always</i>	32 (50.8)	31 (49.2)	
How would you evaluate the frequency of asking questions of the lecturer during the distance course?	<i>Never/ Rarely</i>	58 (36.9)	99 (63.1)	0.105 ¹
	<i>Sometimes</i>	94 (31.2)	207 (68.8)	
	<i>Often / Always</i>	55 (41.4)	78 (58.6)	
What is your opinion on the effective use of the duration of the course given by distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	48 (35.6)	87 (64.4)	0.609 ¹
	<i>Sometimes</i>	51 (31.9)	109 (68.1)	
	<i>Often / Always</i>	108 (36.5)	188 (63.5)	
Do you experience technological/technical problems (disconnection, system not working, storage problems, etc.) during distance education?	<i>Never/ Rarely</i>	58 (45.3)	70 (54.7)	0.021¹
	<i>Sometimes</i>	71 (31.3)	156 (68.7)	
	<i>Often / Always</i>	78 (33.1)	158 (66.9)	
Have any lecturers reported that they could not attend the distance education course due to technological/technical difficulties?	<i>Yes</i>	115 (33.4)	229 (66.6)	0.337 ¹
	<i>No</i>	92 (37.2)	155 (62.8)	
Do you think distance education provides effective learning?	<i>Yes</i>	56 (46.3)	65 (53.7)	0.005¹
	<i>No</i>	98 (30.0)	229 (70.0)	
	<i>Undecided</i>	53 (37.1)	90 (62.9)	
How often do you watch the recorded videos of a course you took with distance education?	<i>Never</i>	13 (24.1)	41 (75.9)	<0.001²
	<i>1 time</i>	67 (30.2)	155 (69.8)	
	<i>2 times</i>	66 (37.5)	110 (62.5)	
	<i>3 times</i>	25 (31.6)	54 (68.4)	
	<i>4 times</i>	8 (72.7)	3 (27.3)	
	<i>5 times or more</i>	28 (57.1)	21 (42.9)	

Table 7 (continued): Distribution of answers to prior experience of distance education.

When you compare distance education and face-to-face education methods, which one do you prefer?	<i>Face-to-face education method</i>	131 (32.1)	277 (67.9)	0.019¹
	<i>Distance education method</i>	52 (46.4)	60 (53.6)	
	<i>Undecided</i>	24 (33.8)	47 (66.2)	
Do you think distance education has some advantages?	<i>Yes</i>	145 (36.0)	258 (64.0)	0.330 ¹
	<i>No</i>	44 (36.4)	77 (63.6)	
	<i>Undecided</i>	18 (26.9)	49 (73.1)	
Do you think distance education has some disadvantages?	<i>Yes</i>	161 (31.3)	345 (68.7)	<0.001¹
	<i>No</i>	27 (61.4)	17 (38.6)	
	<i>Undecided</i>	19 (59.4)	13 (40.6)	
How would you evaluate the use of distance education in applied courses?	<i>Definitely applicable</i>	24 (58.5)	17 (41.5)	0.007²
	<i>Definitely not applicable</i>	127 (31.8)	272 (68.2)	
	<i>Partially applicable</i>	53 (37.6)	88 (62.4)	
	<i>Undecided</i>	3 (30.0)	7 (70.0)	
Which method do you think should be used for the assessment and evaluation of the course you take with distance education?	<i>Face-to-face assessment</i>	34 (42.0)	47 (58.0)	0.240 ¹
	<i>Online assessment</i>	156 (33.3)	312 (66.7)	
	<i>Undecided</i>	17 (40.5)	25 (59.5)	
Which assessment method do you prefer in distance education?	<i>Open-ended questions exam</i>	6 (28.6)	15 (71.4)	0.067 ²
	<i>Multiple choice exam</i>	98 (31.4)	214 (68.6)	
	<i>Oral exam</i>	2 (100.0)	-	
	<i>Homework presentation</i>	52 (37.1)	88 (62.9)	
	<i>Hybrid assessment including a combination of one or more of the open-ended questions exam, multiple choice exam, oral exam, and homework presentation</i>	49 (42.2)	67 (57.8)	
Do you think that online/remote exams are held securely (students answer questions by being honest)?	<i>Yes</i>	61 (37.9)	100 (62.1)	0.103 ¹
	<i>No</i>	87 (30.7)	196 (69.3)	
	<i>Undecided</i>	59 (40.1)	88 (59.9)	
Would you like to continue distance education after switching to face-to-face education again?	<i>Yes</i>	65 (47.1)	73 (52.9)	0.009¹
	<i>No</i>	64 (31.4)	140 (68.6)	
	<i>Sometimes</i>	73 (31.6)	158 (68.4)	
	<i>Undecided</i>	5 (27.8)	13 (72.2)	

¹: Pearson Chi-Square²: Fisher's Exact Test

DISCUSSION AND CONCLUSION

Distance education is a method that includes simultaneous education that prioritizes student-teacher interaction and a model that allows the students to access the educational material at any time and place independently of the educator and to review it as many times as they want (Tsai et al. 2021; Wagner et al. 2021). Compared to the traditional education method, DE is considered advantageous for accessing information whenever and wherever the students want. With distance education and online teaching/learning model, flexibility is provided to the lecturer and student regarding learning activities (Houlden and Veletsianos 2019; Dost et al. 2020; Veletsianos et al. 2021; Wagner et al. 2021). As mentioned in a study (Parkes and Barrs 2021), not needing the time allotted to travel to reach education, in other words, saving time, can be considered as another advantage of DE. In addition, for students whose preferred learning methods are different from each other, training can be done by listening, seeing, or repeating a lot in accordance with the personal learning technique (Choudhary 2021). Thanks to the online teaching and learning activities, communication and professional cooperation development among students are also observed in extracurricular processes such as preparing homework and doing research. There is evidence that online methods could also be a crucial tool in education post-pandemic, according to positive feedbacks from students and educators (Saadeh et al. 2021). However, according to Liu et al. (2021), lack of adequate teachers' feedback and less interaction among students are considered cons of DE. The results of a study (Parkes and Barrs 2021) also showed that students experience anxiety due to lack of interaction. It has been reported (Di Giacomo and Di Paolo 2021; Başağaoğlu Demirekin and Buyukcavus 2022) that anxiety developing due to the pandemic negatively affects the DE experiences of students. Dost et al. (2020) emphasized that online teaching methods should be included in traditional medicine education, supporting this view. In Tables 2 and 3, the deficiencies in the living environment, technological inadequacies and the lack of verbal interaction between student and teacher based on asking and answering questions are striking. On the other hand, according to Table 6, a group of participants (3rd and 4th grades) reported that they could continue distance education in the future due to some advantages. When all the pros and cons are evaluated, it can be predicted that if the strengths of DE model are preserved and its open aspects are improved, DE can be one of the routine education models applied in veterinary education in the future.

According to Table 1, 55.3% of students reported that distance education does not provide effective learning. However, students who want to benefit from online learning of distance education somehow in their education life constitute 62.5% of all participants (Table 1). There are evidences in the literature (Dost et al. 2020; Ahmady et al. 2021) that simulation-based methods are used for how distance education can be made more efficient. Based on the findings of the study and the relevant literature, it can be predicted that adding simulation methods to the distance education process can contribute to effective learning by attracting the attention of some students.

In this study, it can be said that the majority of students (69%) prefer face-to-face education (Table 1).

As seen in Table 5, face-to-face education and distance education were compared and a statistically significant difference was found between student answers in terms of practical courses. Similarly, Aslim et al. (2023) have reported that many students (77%) do not want to continue practical courses remotely, and many students have concerned that their professional development may be adversely affected as the practical lessons are not held face-to-face. When the data of these two studies are evaluated together, it can be said that veterinary students tend to prefer the traditional face-to-face education model. Nevertheless, in a study (Ahmady et al. 2021) investigating DE strategies in the field of medicine, it was reported that simulation-based teaching and technology-based teaching are frequently preferred techniques among online methods during the pandemic period. In another study (Dost et al. 2020), the potential of virtual consultations to take place more frequently in medical education was mentioned. As a solution proposal, it is suggested that in the future, simulation-based teaching and OSCEs for evaluation may be preferred in veterinary training as well as in medical education to improve and assess both clinical and communication skills, whether online or face-to-face education.

In Table 4, the frequency of asking questions of students to the teacher and/or the teacher to the students was asked and it was associated with in-class communication and interpersonal communication. A study (Di Giacomo and Di Paolo 2021) revealed that one of the main concerns of academics is the lack of interaction which can be experienced during the online model. According to Mehall (2020), students' interactions with each other and with the institution often affect their education. Based on this data, it can be argued that interpersonal interaction in online education can be an essential behavior both for students and academics.

According to the Equivalency Theorem, which was brought to the literature by Anderson (2003), the ability of students to perform high-level learning activities in the DE process is directly dependent on the interaction between the student-teacher-content trio (Miyazoe and Anderson 2010). In other words, it has been reported that communication among students or between teachers and students is an important factor in student satisfaction (Miyazoe and Anderson 2010; Eom and Ashill 2016; Elshami et al. 2021). It is clearly seen that there is a significant relationship between students' satisfaction levels and their course success (Elshami et al. 2021). The current study was not designed to reveal in detail the relationship and communication levels between students and teachers, but only gave information about asking questions, which is one of the elements of interpersonal communication. However, it can be said that further studies are needed to determine whether the student-teacher relationship affects the quality of distance education at a veterinary faculty in Türkiye.

According to Table 4, it has been shown that the frequency of asking questions by students and teachers is associated with effective learning. Based on the studies (Dixson 2015; Chan et al. 2021) it can be inferred that students' motivation directly affects learning. Moreover, it is claimed that the motivation of the lecturers depends on the interaction with the students (Li et al. 2021). It can be said that teachers' increasing in-class interaction can contribute positively to effective learning. Furthermore, in order to experience a beneficial learning process and overcome the students' hesitations, lecturers can be suggested to carry out activities that break the ice, refresh

the self-confidence and motivate the students at the beginning of the courses.

Aslm et al. (2023) have reported that the ability of accessing online material is an advantage. In our study, students had the chance to watch recorded lectures multiple times (Table 5). This is seen as an opportunity for each student to reach their learning capacity and is considered as flexible learning and temporal flexibility. In other words, students can watch their course recordings anywhere, anytime, and over and over with any device. This can be considered as an indication of the flexibility of online learning. On the other hand, the number of students who evaluated the comfort of their place of residence as average or below and, accordingly, the number of students with low frequency of attendance cannot be ignored. This situation can be considered as the disadvantages of online education.

According to the Table 1, students participated in online courses from different physical environments such as family/relative house, student house or dormitory/guesthouse, apart from school. The options of different learning environments reported in Table 1, are consistent with the statement of flexibility of DE reported by Turan et al. (2022). This can be considered an indication that distance education offers flexible learning options regardless of a specific location. Similarly, with reference to Table 1, students accessed the courses not only with personal phones, computers or tablets, but also with the electronic devices of others. There is evidence in the literature (Turan et al. 2022) showing that distance education is open to different options in terms of technology. Therefore, the data shown in Table 1 can be considered as an example of the technological flexibility of distance education.

When Table 2 and Table 3 are evaluated together, it is clearly revealed that students living in a comfortable area benefit more from DE. According to Table 2, students living in a comfortable environment preferred DE relatively higher than others. Moreover, it has been seen that the comfortable living environments in which the student attends the courses affects the frequency of asking questions in the lesson. It is known that ambient of the learning environments such as silence, adequate lighting, suitable furniture, learning devices, high-speed Internet and wireless connection are directly related to DE (Ng 2021). With reference to both literature and results of the current study, it can be argued that students with optimum environmental conditions have the potential to benefit more from distance education than others.

One of the most important conditions for students to see DE as an effective learning method are that the technological infrastructure is sufficient and the places where they attend the courses are comfortable (Table 4). There are various studies in the literature (Abbasi et al. 2020; Elshami et al. 2021; Parkes and Barrs 2021; Yeh and Tsai 2022) reporting that a significant portion of students' experience technological problems in online teaching. It has been reported in some studies (Abbasi et al. 2020; Elshami et al. 2021; Yeh and Tsai 2022) that technical problems break the motivation of students, negatively affect them, or cause them to experience dissatisfaction. O'Doherty et al. (2018) showed that physical and technological infrastructure problems, like poor internet connection, are noted among the substantial obstacles for DE. In order to solve these problems, optimizing the exam phase or the resources to be used in the course for students who will attend the course from places with

insufficient internet access might be beneficial (Li et al. 2021). On the other hand, Abbasi et al. (2020) reported that students' satisfaction with DE is higher in developed countries. It is clearly seen that the data in the findings of the study and the literature are compatible with each other and establish a mutual relationship between distance education and environmental factors. It is thought that economically disadvantaged students may be more motivated if universities or governments support students in need in reaching both the optimum environmental conditions mentioned by Ng (2021) and technological tools.

There are many studies (Abbasi et al. 2020; Ahmed et al. 2020; Choudhary 2021; Ertürk Avunduk and Delikan 2021; Mehta et al. 2021) in the literature reporting that the inadequacy of technological resources caused by socioeconomic features negatively affects the effectiveness of distance education. Table 2 and Table 3 may provide some evidence that the ambience and technological infrastructure of the living place have an impact on the effectiveness of distance education. Indeed, students with a sufficient and efficient internet connection and easy access to technological devices such as personal phones, computers, and tablets, which are used as DE tools, can attend the courses given by DE more easily. However, financially incompetent students or those residing in places with weak internet infrastructure may cause negative attitudes towards DE. Students who participated in this study and had technological infrastructure problems may also have encountered problems such as disconnection during the lesson, microphone or camera not working, insufficient internet quota, and inability to access lecture recordings or other resource materials. The fact that students living in dormitories, in other words, students who usually share the same room and technological infrastructure with more than one person, have some problems attending classes may have prepared the ground for these students to consider DE as disadvantageous. It is not surprising that students in this group tend not to prefer DE in the future. It is thought that for each student to benefit from the distance education, to balance income inequality, in other words, to ensure justice in education, educational institutions should provide access to the appropriate technological infrastructure at a minimum level. Therefore, it can be said that if the aforementioned conditions of the students are improved, the students can get the maximum benefit by getting one step closer to the learning outcomes and objectives of the course.

In this study, almost half of the students (47.9%) reported that online exams were not conducted honestly (Table 1). Similarly, in the literature (Hunt and Anderson 2022), a case of dishonest academic conduct has been reported for remotely conducted objective structured clinical examinations (OSCEs), which aim acquisition and measurement of clinical skills. In this context, it is believed that it would be beneficial to make constructive criticisms to the students about their academic honesty not only during online education, but throughout their entire education life, and to instill this doctrine within the hidden curriculum. In addition of this view, further research is needed to measure and improve students' academic honesty.

Within the scope of this study, during DE, it is seen that the frequency of the first graders asking questions is less than the other grades (Table 6). One of the most important success criteria of distance education is classroom interaction (Flottemesch 2000), and it can be more

effective than individual student participation in learning satisfaction (Fulford and Zhang 1993). For this reason, the fact that some students tend to ask fewer questions should not be considered a problem as long as it does not disrupt the interaction dynamic in the classroom. However, it may be considered normal that students tend to ask fewer questions and hesitate to actively participate in courses. In addition, it is thought that this hesitation may have occurred because first grade students who have just started university encounter a different teaching style, DE, in a different educational institution than high school. In addition, as a negative outcome of the social distance rule during the pandemic, the limited communication/interaction of the students in the classroom with each other and with the lecturers may have caused them to exhibit shy attitudes and not have the courage to ask questions.

It is clearly seen that some students (Abbasi et al. 2020, Aslm et al. 2023) do not prefer DE especially in practical courses. However, in this study, it is considered a surprising result that third and fourth graders do not see DE as disadvantageous (Table 6). As a matter of fact, practical courses on clinical veterinary medicine gain weight in the third and fourth grades of veterinary faculties in Turkish. Therefore, in line with the mentioned literature, it was expected in our study that students in third and fourth grades would not prefer DE due to their inability to practice.

As seen in Table 7, it was determined that students without DE experience did not or sometimes wanted to continue DE after switching to face-to-face education ($p=0.009$). In addition, among those who were undecided about continuing DE in the future, the rate of students who have no previous DE experience was quite high (72.2%). It has been seen that having experience in DE positively affects students' participation in the course (Table 7). Although some of the first-year students had both online and face-to-face education experience in the previous periods, they only received distance education in their university education due to the pandemic. This may have affected the answers of first-year students to some of the survey questions. This situation can be considered as a limitation of the study. However, according to a study conducted with medical students (Al-Balas et al. 2020), students with previous distance education experience were significantly more satisfied with DE than others. Secondly, the blended method, in which both traditional and distance education are planned jointly, could be used as a suitable method in the future. When the aforementioned literature and the results of this study are combined, it can be argued that providing distance education in addition to traditional education may be accepted by future's veterinary students. In conclusion, flexibility is one of the strengths of DE. Although it has been seen that students generally preferred face-to-face education, the existence of a group of students who wanted to continue distance education and reported that the method has some advantages is also remarkable. The difficulty of accessing the course due to the lack of technological infrastructure is seen as a major disadvantage. It can be considered that living in favorable conditions is positively related to students' ability to benefit from distance education.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

The second author of the study (Dr. K. Pınar Ambarcıoğlu Kısaçam) passed away due to the earthquake disaster that took place in Türkiye on February 6, 2022. Publication period of this article has begun after her death. This study is dedicated to Dr. K. Pınar Ambarcıoğlu Kısaçam and her family, who passed away.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: PA
Supervision / Consultancy: PA, AÜA
Data Collection and / or Processing: PA, AÜA
Analysis and / or Interpretation: PA, AÜA
Writing the Article: PA
Critical Review: PA

REFERENCES

- Abbasi MS, Ahmed N, Sajjad B et al. (2020). E-learning perception and satisfaction among health sciences students amid the COVID-19 pandemic. *Work*, 67 (3), 549-556.
- Ahmady S, Kallestrup P, Sadoughi MM et al. (2021). Distance learning strategies in medical education during COVID-19: A systematic review. *J Educ Health Promot*, 10, 421.
- Ahmed SA, Hegazy NN, Malak HWA et al. (2020). Model for utilizing distance learning post COVID-19 using (PACT)[™] a cross sectional qualitative study. *BMC Med Educ*, 20, 400.
- Al-Balas M, Al-Balas HI, Jaber HM et al. (2020). Distance learning in clinical medical education amid COVID-19 pandemic in Jordan: Current situation, challenges, and perspectives. *BMC Med Educ*, 20 (1), 341.
- Anderson T (2003). Getting the mix right again: An updated and theoretical rationale for interaction. *Intl Rev Res Open Dis*, 4 (2), 1-14.
- Armstrong-Mensah E, Ramsey-White K, Yankey B, Self-Brown S (2020). COVID-19 and distance learning: Effects on Georgia State University School of Public Health students. *Front. Public Health*, 8, 1-10.
- Armutak A (2021). Veterinary ethics in the Covid-19 pandemic. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 4 (Suppl.1), 63-73.
- Aslm G, Tekindal MA, Yiğit A, Sanal Ş, Menteş A (2023). Evaluation of the attitudes and opinions of veterinary school students on distance education during the COVID-19 pandemic. *J Vet Med Educ*, In Press, DOI: 10.3138/jvme-2021-0150.
- Başağaoğlu Demirekin Z, Buyukcavus MH (2022). Effect of distance learning on the quality of life, anxiety and stress levels of dental students during the COVID-19 pandemic. *BMC Med Educ*, 22 (1), 309.
- Can N, Köroğlu Y (2020). Covid-19 döneminde yayınlaşan uzaktan eğitimin değerlendirilmesi ve eğitim emekçileri açısından incelenmesi. *Madde, Diyalektik ve Toplum*, 3 (4), 370-380.
- Chan SL, Lin CC, Chau PH, Takemura N, Fung JTC (2021). Evaluating online learning engagement of nursing students. *Nurse Educ Today*, 104, 104985.
- Choudhary OP (2021). Online veterinary anatomy education in the era of COVID-19 pandemic: Pros and cons. *Int J Morphol*, 39 (4), 1231-1233.
- Çelik E, Daniş EM, Aslm G, Tekindal MA, Yaşar A (2022). An evaluation on coping with stress of Selçuk University Faculty of Veterinary Medicine students: Covid-19 pandemic process. *Eurasian J Vet Sci*, 38 (1), 50-58.
- Di Giacomo P, Di Paolo C (2021). Covid-19 and dental distance-based education: Students' perceptions in an Italian University. *BMC Med Educ*, 21 (1), 414.
- Di Pietro G, Biagi F, Costa P, Karpiński Z, Mazza J (2020). The likely impact of COVID-19 on education: Reflections based on the existing literature and international datasets. Erişim Tarihi:10.04.2021 Erişim Adresi: <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC121071>
- Dixon MD (2015). Measuring student engagement in the online course: The Online Student Engagement Scale (OSE). *Online Learn J*, 19 (4), EJ1079585.
- Dost S, Hossain A, Shehab M, Abdelwahed A, Al-Nusair L (2020). Perceptions of medical students towards online teaching during the COVID-19 pandemic: A national cross-sectional survey of 2721 UK medical students. *BMJ Open*, 10 (11), e042378.
- Elshami W, Taha MH, Abuzaid M et al. (2021). Satisfaction with online learning in the new normal: Perspective of students and faculty at

- medical and health sciences colleges. *Med Educ Online*, 26 (1), 1920090.
- Eom SB, Ashill N (2016)**. The determinants of students' perceived learning outcomes and satisfaction in university online education: An update. *Decis Sci J Innov Educ*, 14 (2), 185-215.
- Ertürk Avunduk AT, Delikan E (2021)**. Satisfaction and stress levels of dentistry students relating to distance education. *Dent Med Probl*, 58 (3), 291-298.
- Flottemesch K (2000)**. Building effective interaction in distance education: A review of the literature. *Educational Technology*, 40 (3), 46-51.
- Fulford CP, Zhang S (1993)**. Perceptions of interaction: The critical predictor in distance education. *Am J Distance Educ*, 7 (3), 8-21.
- Gebril M, Smith Brilliant M, Glogauer M, Set S (2021)**. Evaluation of the online learning experience of Dalhousie dentistry and dental hygiene students during COVID-19 pandemic outbreak. *J Can Dent Assoc*, 87, 18.
- Gençoğlu C, Çiftçi M (2020)**. Covid-19 salgınında eğitim: Türkiye üzerinden bir analiz. *Journal of History School*, 46, 1648-1673.
- Harvey HL, Parahoo S, Santally M (2017)**. Should gender differences be considered when assessing student satisfaction in the online learning environment for millennials? *High Educ Q*, 71(2), 141-158.
- Houlden S Veletsianos G (2019)**. A posthumanist critique of flexible online learning and its "anytime anyplace" claims. *Br J Educ Technol*, 50 (3), 1005-1008.
- Hunt JA, Anderson SL (2022)**. Remote assessment of veterinary clinical skills courses during the COVID-19 pandemic. *J Vet Med Educ*, 49 (1), 16-24.
- Kafes AY, Yıldırım A (2021)**. Üniversite Öğrencilerinin Uzaktan Eğitim Memnuniyeti Ölçeği'nin geliştirilmesi: Geçerlik ve güvenilirlik çalışması. *Turkish Studies*, 16 (6), 1641-1657.
- Kim SY, Kim SJ, Lee SH (2021)**. Effects of online learning on nursing students in South Korea during COVID-19. *Int J Environ Res Public Health*, 18 (16), 8506.
- Koort J, Ávall-Jääskeläinen S (2021)**. Redesigning and teaching veterinary microbiology laboratory exercises with combined on-site and online participation during the COVID-19 pandemic. *FEMS Microbiol Lett*, 368 (16), 108.
- Li W, Gillies R, He M et al. (2021)**. Barriers and facilitators to online medical and nursing education during the COVID-19 pandemic: Perspectives from international students from low- and middle-income countries and their teaching staff. *Hum Resour Health*, 19 (1), 64.
- Liu X, He W, Zhao L, Hong JC (2021)**. Gender differences in self-regulated online learning during the COVID-19 lockdown. *Front Psychol*, 12, 752131.
- Mahdy MAA, Sayed RKA (2022)**. Evaluation of the online learning of veterinary anatomy education during the Covid-19 pandemic lockdown in Egypt: Students' perceptions. *Anat Sci Educ*, 15 (1), 67-82.
- Mehall S (2020)**. Purposeful interpersonal interaction in online learning: What is it and how is it measured? *Online Learning*, 24 (1), 182-204.
- Mehta V, Oppenheim R, Wooster M (2021)**. Distance learning in surgical education. *Curr Surg Rep*, 9 (9), 23.
- Miyazoe T, Anderson T (2010)**. The Interaction Equivalency Theorem. *J Interact Online Learn*, 9 (2), 94-104.
- Moore JL, Dickson-Deane C, Galyen K (2011)**. e-Learning, online learning, and distance learning environments: Are they the same?. *Internet High Educ*, 14, 129-135.
- Ng CF (2021)**. The physical learning environment of online distance learners in higher education – A conceptual model. *Front Psychol*, 12, 635117.
- O'Doherty D, Dromey M, Lougheed J et al. (2018)**. Barriers and solutions to online learning in medical education - an integrative review. *BMC Med Educ*, 18, 130.
- Oncu S, Cakir H (2011)**. Research in online learning environments: Priorities and methodologies. *Computers & Education*, 57 (1), 1098-1108.
- Parkes RSV, Barrs VRD (2021)**. Interaction identified as both a challenge and a benefit in a rapid switch to online teaching during the COVID-19 pandemic. *J Vet Med Educ*, 48(6), 629-635.
- Rutkowska A, Liska D, Cieślík B et al. (2021)**. Stress levels and mental well-being among Slovak students during e-learning in the Covid-19 pandemic. *Healthcare (Basel)*, 9 (10), 1356.
- Saadeh K, Henderson V, Paramasivam SJ, Jeevaratnam K (2021)**. To what extent do preclinical veterinary students in the UK utilize online resources to study physiology. *Adv Physiol Educ*, 45 (1), 160-171.
- Sandhu P, de Wolf M (2020)**. The impact of COVID-19 on the undergraduate medical curriculum. *Med Educ Online*, 25 (1), 1764740.
- Silva PGDB, de Oliveira CAL, Borges MMF et al. (2021)**. Distance learning during social seclusion by COVID-19: Improving the quality of life of undergraduate dentistry students. *Eur J Dent Educ*, 25 (1), 124-134.
- Tsai CL, Ku HY, Campbell A (2021)**. Impacts of course activities on student perceptions of engagement and learning online. *Distance Educ*, 42 (1), 106-125.
- Turan Z, Kucuk S, Cilligol Karabey S (2022)**. The university students' self-regulated effort, flexibility and satisfaction in distance education. *Int J Educ Technol High Educ*, 19, 35.
- Türkiye Bilim Terimleri (2020)**. Türkiye Bilim Terimleri (TBT)'nin amacı nedir?. Erişim Tarihi: 28 Eylül 2023. Erişim Adresi: <https://www.bilimterimleri.com/aciklamalar/tr-index.html>.
- Veletsianos G, Kimmons R, Larsen R, Rogers J (2021)**. Temporal flexibility, gender, and online learning completion. *Distance Educ*, 42 (1), 22-36.
- Wagner MN, Kupriyanova M, Ovezova U, Ilina A (2021)**. Distance learning courses: New opportunities for the development of university education. *Propós Represent*, 9 (3), e1275.
- Yeh CY, Tsai CC (2022)**. Massive distance education: barriers and challenges in shifting to a complete online learning environment. *Front Psychol*, 13, e928717.



Detection and Molecular Characterization of *Canine Coronavirus* Based on Partial Membrane Gene Sequences

Zeynep KARAPINAR^{1,*} M. Özkan TİMURKAN²

¹Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 10010, Balıkesir, Türkiye

²Atatürk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Virology, 25200, Erzurum, Türkiye

Received: 25.05.2023

Accepted: 10.10.2023

ABSTRACT

Canine coronavirus (CCoV) infection in dogs is common all over the world and progresses with gastroenteritis findings. Infection as a result of complications with secondary factors may result in death, especially in puppies. The virus, which is excreted in the feces, spreads indirectly through the contamination of food, water, and the environment. This study, it was aimed at revealing the CCoV infection and obtaining current molecular information about the infection. In addition, molecular characterization of CCoV strains circulating in the region was made based on the M (membrane protein) gene. The study material consisted of stool samples from 12 dogs with gastroenteritis findings. The amplified PCR products were subjected to sequence analysis and a phylogenetic tree was constructed by comparing them with different reference CCoV isolates from GenBank. In the phylogenetic tree, 1 of the 5 positive samples was determined to be CCoV-I, and 4 samples were determined to be CCoV-IIa. It was determined that the strains obtained were 85.4 - 97.7% similar among themselves and 82.7-98% similar to other strains obtained from GenBank. As a result of study, current molecular information about CCoV circulating in the Balıkesir region was obtained. With this study, it is thought that new research on the existence and molecular epidemiology of CCoV infection in Türkiye will make important contributions to vaccine studies and the control of infection.

Keywords: *Canine coronavirus, PCR, Phylogenetic analysis.*

öz

Canine Coronavirusun Tespiti ve Kısmi Membran Gen Dizisi Temelli Moleküler Karakterizasyonu

Köpeklerin Koronavirüs (CCoV) enfeksiyonu tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve gastroenteritis bulguları ile seyretmektedir. Sekonder etkenlerle komplikasyon sonucunda enfeksiyon, özellikle yavru köpeklerde ölümlerle sonuçlanabilir. Dışkı ile atılan virus, dışkının yeme, suya ve çevreye bulaşmasıyla indirekt olarak yayılır. Yapılan bu çalışmada CCoV enfeksiyonunun ortaya konması, enfeksiyona ilişkin güncel moleküler bilgilerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, bölgede dolaşan CCoV suşlarının M (membran proteini) genine dayalı moleküler karakterizasyonu da yapılmıştır. Çalışma materyalini, gastroenteritis semptomları gösteren 12 adet köpeğe ait gaita örneği oluşturdu. PCR ürünleri saflaştırdıktan sonra sekans analizine tabi tutuldu ve GenBank veri tabanından sağlanan farklı referans CCoV izolatları ile karşılaştırılarak filogenetik ağaç oluşturuldu. Filogenetik analiz sonucu 5 pozitif örnekten, 1 adedinin CCoV-I, 4 adet örneğin ise CCoV-IIa olduğu tespit edildi. Elde edilen suşların kendi aralarında %85.4-%97.7 oranında, GenBank veri tabanından elde edilen diğer suşlarla aralarında %82,7-%98 oranında benzerlik olduğu tespit edildi. Çalışma sonucunda, Balıkesir bölgesinde sirküle olan CCoV'ye yönelik güncel moleküler bilgiler elde edilmiştir. Bu çalışma ile, Türkiye'de CCoV enfeksiyonunun varlığına ve moleküler epidemiyolojisine ilişkin yapılacak yeni araştırmaların aşı çalışmalarına ve enfeksiyonun kontrolüne önemli katkılar sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Filogenetik analiz, Köpek koronavirüs, PZR.*

INTRODUCTION

Coronaviruses infect humans and many animal species (cattle, dogs, cats, poultry, rabbits, mice, rats, and pigs) with subclinical or moderate-to-severe infections in many organs, notably the respiratory and gastrointestinal systems, causing serious epidemics resulting in death and

significant economic losses (Pratelli et al. 2001; Brownlie and Whittaker 2017; He et al. 2020). Coronaviruses have been classified into four groups (*alphacoronaviruses*, *betacoronaviruses*, *gamacoronaviruses* and *deltacoronaviruses*) in accordance with the virus classification made by the ICTV (International Committee



on Taxonomy of Viruses). *Coronaviruses*, having a large (27–32 kb) genome in the order *Nidovirales*, have diversified extensively, resulting from the high frequency of RNA recombination due to RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) (Singhal 2020).

Canine coronavirus (CCoV), first isolated in 1971, is a prevalent infection characterized by gastroenteritis in dogs (Binn et al. 1974). The clinical symptoms, which often begin with mild enteritis, are exacerbated by the addition of other pathogenic agents to the viral infection and may end in death if mutant or virulent strains spread to multiple organs (pantropic canine coronavirus). Canine respiratory coronavirus (CRCoV) is frequently diagnosed in dogs with respiratory symptoms and contributes to the infectious respiratory disease complex in dogs (Decaro et al. 2008). Although coronavirus infection with enteritis can manifest in dogs of any age, puppies are more commonly affected. Diarrhea, vomiting, dehydration, hemorrhage, and weight loss are observed, especially in infections with other pathogens (Pratelli et al. 1999; Decaro and Lorusso 2020). Deaths usually take place within 24–36 hours after the onset of infection due to severe dehydration (Buonavoglia et al. 2006).

The virus is a member of the *Alphacoronavirus* genus and contains single-stranded positive-polarity RNA (Lai et al. 2001, Haake et al. 2020). The virus has helical symmetry, is surrounded by a membrane, and has a diameter of 60–220 nm (Benetka et al. 2006). Genomic RNA has infectious characteristics (de Vries et al. 1997). The genome of the virus, whose replication cycle takes place in the cytoplasm, encodes four structural proteins: E-envelope, M-membrane, N-nucleocapsid, and S-spike protein, and two non-structural proteins, NS2 and NS4. Canine coronaviruses are divided into two subtypes, CCoV-I and CCoV-II. In addition, CCoV-II is divided into two genotypes, CCoV-IIa and CCoV-IIb (Pratelli et al. 2003).

Studies on spike and membrane proteins have reported that there may be recombinations between FCoV and CCoV. Studies have shown that CCoV-IIa may have resulted from recombination with coronaviruses of cats, and CCoV-IIb may have resulted from recombination with coronaviruses of pigs (Herrewegh et al. 1998; Pratelli 2006; Decaro and Buonavoglia 2011).

The most important mode of transmission of the disease is oral entry of the virus through stool-contaminated materials (fecal-oral route transmission). The virus excreted in feces spreads indirectly by contaminating food, water, and the environment. Asymptomatic dogs have been reported to spread the virus for a prolonged period of time without displaying any clinical signs (Yeşilbağ et al. 2004; Pratelli et al. 2022).

In this study, it was aimed to reveal the CCoV infection and obtain current molecular information about the virus. In addition, molecular characterization of CCoV strains circulating in the region was made based on the M gene.

MATERIAL AND METHODS

Permissions required for this study were obtained from Balikesir University Animal Experiments Local Ethics Committee (Dated: 27/04/2023, Numbered: 2023/3-1).

Samples

The study material consisted of fecal samples from 12 cross-breed dogs, aged between 1–6 months, exhibiting symptoms of gastroenteritis, who attended local veterinary clinics in Balikesir province. Stool samples

taken into stool containers were diluted 1/10 with PBS and centrifuged (3000 rpm, 10 minutes). The supernatant was taken into stock tubes and stored at -20 °C until testing.

Viral RNA extraction, Reverse- Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Extraction of viral RNA from stool specimens was performed with a nucleic acid isolation kit (Viral RNA, DNA Preparation Kit, Jena Bioscience, Germany) in accordance with the kit's procedure. The extracted viral RNA was used as the template for complementary DNA (cDNA) synthesis. Therefore, we used a kit (Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, USA) containing the Reverse Transcriptase enzyme for cDNA synthesis. The first mixture was prepared in a tube for cDNA synthesis. For this purpose, 3 µL of distilled water, 0.5 µL of random hexamer primer, and 3 µL of RNA were added to the tube and the tube was placed in the thermal cycle. After the thermal cycle temperature was 70 °C, the tubes, which were kept at this temperature for 5 minutes, were taken and immediately placed on ice. The second mixture was prepared in another tube containing 2.0 µL of 5x reaction buffer, 1.0 µL of 10 mM dNTP mix and 0.5 µL of M-MuLV reverse transcriptase enzyme in 3.5 µL was added to the tubes containing the first mixture and incubated at 48 °C for 45 minutes. For the PCR reaction, we used 3 ml (50 ng) cDNA. CCV1 (5'-TCC AGA TAT GTA ATG TTC GG-3') and CCV2 (5'-TCT GTT GAG TAA TCA CCA GCT-3') specific primers targeting the partial region (409 bp) of the Canine Coronavirus M (membrane protein) gene were used for RT-PCR (Herrewegh et al. 1998). For PCR amplification processes, a total of 30 µL PCR master mix was formed with the cDNA (3 µL), Tris-HCl (pH 8.8-75 mM), NH₄(SO₄)₂ (20 mM), MgCl₂ (1.5 mM), primers (10 pmol), dNTP (0.2 mM) and Taq-DNA polymerase (0.5 U) (Thermoscientific Taq DNA polimerase, USA). For the PCR, after 35 cycles; denaturation (94 °C for 30 sec), annealing (55 °C for 30 sec) and extension (72 °C for 1 min) final extension (72 °C for 10 min) was carried out. RNase-free water was used as the negative control in RT-PCR processes. The obtained PCR products were subjected to gel electrophoresis. Amplified PCR products were stained with gel red on a 2% agarose gel. Evaluation of PCR products was completed using standard 100 bp under UV light in a Gel Imaging Device.

Sequence Analysis

Amplified PCR products were purified and sequenced by BMLabosis (Ankara, Türkiye). The alignment of the raw data obtained with the Clustal W algorithm of the BioEdit version 7.0.5 program has been completed (Hall 1999). The NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Length Alignment Search Tool) search engine was used to compare the obtained sequences with other similar data in the GenBank data system. Phylogenetic analysis was done using MEGA v6.0 software. To this end, the neighbor-joining method with a Kimura-2 parameter distance matrix model in the programme MEGA version 11.0 was used. The bootstrap value was calculated as 1000 replicates (Tamura et al. 2021).

RESULTS

CcoV nucleic acid was detected in five (41.6%) of the fecal samples of 12 dogs tested for canine coronavirus. A phylogenetic tree was created using the sequences obtained from the studies and the sequences obtained

from GenBank. The phylogenetic tree showed that one out of five positive samples was CCoV-I, and four positive samples were CCoV-IIa (Figure 1). When the similarity rates were analyzed, it was found that the CCoV-IIa strains identified in this study were 93.4–97.7% similar among themselves and 82.7–98% similar to CCoV-IIs identified from Türkiye and different countries. CCoV-IIa strains identified in the study were found to be similar to

one CCoV-I strain at a rate of 85.4–88.1%. When the CCoV-I strain identified in the study was compared with CCoV-I strains identified from different countries, it was found that the similarity rate varied between 94.6% and 95.7%. GenBank acceptance numbers of the samples (TR/Bal/CCV10/1-OR862749; TR/Bal/CCV10/2-OR862750; TR/Bal/H4-OR862747; TR/Bal/B10-OR862748; TR/Bal/B5-OR862751) have been assigned.

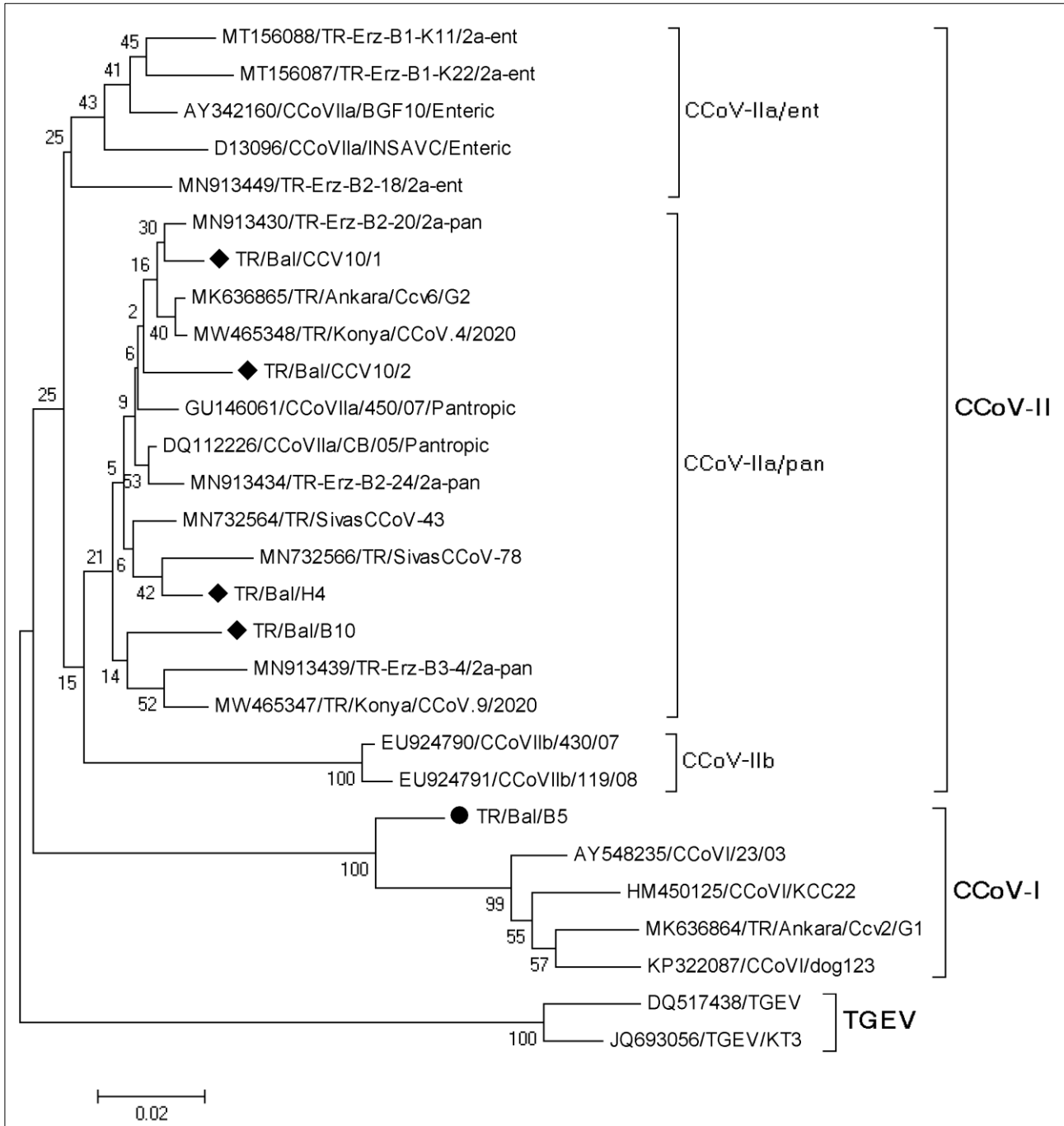


Figure 1: Phylogenetic tree constructed with nucleotide sequences based on CCoV partial M gene.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Coronaviruses that cause infection in all species have a wide host spectrum. In susceptible species, they cause infections, sometimes subclinical and sometimes with symptoms such as hepatitis, reproductive disorders, encephalomyelitis, and nephritis, especially respiratory and digestive system diseases, and may result in death (Brownlie and Whittaker 2017; Radford et al. 2021).

Coronavirus infections can cause serious epidemics. The coronaviruses, with a large RNA, are highly mutable and can expand their host range due to this feature (Brownlie and Whittaker 2017; Ozan and Tamer 2020; Lednicky et al. 2022; Li et al. 2023). Given these characteristics, it is important to conduct new studies on coronaviruses in all species. This study aims to determine the presence of the causative agent in Balikesir province and to reveal the heterogeneity of the strains circulating in the region and

the strains obtained in national and international studies at the M gene level.

There are serological studies on the presence of canine coronavirus in Türkiye. Serological studies have shown that the presence of CCoV Ab is 74.3%, 73.4%, 96.6%, 96.5%, and 75.2% (Yeşilbağ et al. 2004; Ataseven et al. 2005; Gür and Civelek 2007; Gür et al. 2008, Avcı et al. 2016). These data reveal a high prevalence rate of infection in Türkiye.

There are studies on M and S gene regions using the RT-PCR technique in the diagnosis of CoV (Decaro et al. 2009; d Alexandry et al. 2015). The M gene region is used to determine the presence of infection since it is a protected region. Although it is a protected region, it has been found in studies that mutations in the M gene provide some opportunities for the virus to escape from the host immune system (Pratelli et al. 2003; Pratelli 2006). Likewise, in this study, RT-PCR analysis was carried out by using primers that focused on the CCoV M gene region. Thus, it was aimed to identify the mutations in the M gene and to compare the CCoV sequences obtained after sequence analysis with different sequences. The study showed that the CCoV-I and CCoV-II strains showed high similarities with the types identified in Türkiye and in other countries in previous years.

There are a limited number of studies on the virological investigation and molecular characterization of canine coronavirus in Türkiye. In their study, Yeşilbağ et al., (2007) identified the presence of CCoV nucleic acid in fecal samples taken from unvaccinated dogs at the rate of 15.5% by RT-PCR. In the study, type-specific primers were used, and five of the positive samples were identified as CCoV-I. Another study found a CCoV Ag positivity rate of 14.87% by ELISA in fecal samples obtained from Adana province (Avcı et al. 2016). Similar to the present study, previous studies (Akkutay Yoldar et al. 2020; Timurkan et al. 2021; Doğan and Köse 2022) on the molecular characterization of the virus in Türkiye that identified both CCoV-I and CCoV-II have indicated that different types of the virus are circulating in Türkiye at the same time. In this study, CCoV-I and CCoV-II strains were identified in the sequences obtained after sequence analysis, and the strains and vaccine strains in Türkiye in past years had high similarities.

In reviews based on the PCR results of the presence of CCoV nucleic acid worldwide, positivity rates ranging from 15.5-57.3% have been reported in countries such as Türkiye, Italy, Japan, the USA, England, Hungary, Greece, and China (Soma et al. 2011; Dong et al. 2022). Various inactivated and modified live vaccines are used in vaccination programs undertaken in Türkiye and around the world for protection against CCoV infection in dogs (Pratelli et al. 2003). Although it has been reported that the existing vaccines are safe and attenuate CCoV replication in the intestinal system, it is not possible to prepare them adequately since they are produced by using classical virus types in vaccine production (Tizard 2020). Therefore, it is necessary to identify the circulating field isolates and incorporate them into the vaccines. Although vaccination practices vary worldwide, it is necessary to consider the circulating virus strains in the vaccine studies to be carried out, the high recombination risks in coronaviruses, and even the possibility of interspecies transmissions. It should be noted that CCoV infections may lead to more severe symptoms and high mortality when they are associated with other viral or bacterial pathogens. The study provided up-to-date

information about CCoV circulating in the Balıkesir region of Türkiye. It is believed that further studies on the presence and molecular epidemiology of canine coronavirus infection in Türkiye would make significant contributions to vaccine studies and the control of infection.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: ZK, MÖT

Supervision / Consultancy: ZK

Data Collection and / or Processing: ZK

Analysis and / or Interpretation: ZK, MÖT

Writing the Article: ZK

Critical Review: ZK, MÖT

REFERENCES

- Akkutay-Yoldar ZA, Koç BT, Oguzoglu TC (2020).** Phylogenetic analysis of partial membrane protein gene of canine coronaviruses detected in Turkey. *Ankara Univ Vet Fak*, 67 (3), 265-271.
- Ataseven VS, Ucar H, Akca Y (2005).** Canine coronavirus antibodies in stray dogs. *Indian Vet J*, 82 (7), 782-783.
- Avcı O, Bulut O, Yapıcı O, Hasircioglu S, Simsek A (2016).** Canine coronavirus infection in dogs in Turkey: Virological and serological evidence. *Indian J Anim Res*, 50 (4), 565-568.
- Benetka V, Kolodziejek J, Walk K, Rennhofer M, Möstl K (2006).** M gene analysis of atypical strains of feline and canine coronavirus circulating in an Austrian animal shelter. *Vet Rec*, 159 (6), 170-174.
- Binn LN, Lazar EC, Keenan KP, et al. (1974).** Recovery and characterization of a coronavirus from military dogs with diarrhea. *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*, 78, 359-66.
- Buonavoglia C, Decaro N, Martella V et al. (2006).** Canine coronavirus highly pathogenic for dogs. *Emerg Infect Dis*, 12 (3), 492-494.
- Brownlie J, Whittaker G (2017).** Coronaviridae. In: Fenner's veterinary virology 5. Edition, Elsevier Inc, United Kingdom.
- Decaro N, Buonavoglia C (2008).** An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol*; 132:221-34.
- Decaro N, Mari V, Campolo M et al. (2009).** Recombinant canine coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus of Swine are circulating in dogs. *J Virol*, 83 (3), 1532-1537.
- Decaro N, Buonavoglia C (2011).** Canine coronavirus: not only an enteric pathogen. *Vet Clin N Am-Small*, 41 (6), 1121-1132.
- Decaro N, Lorusso A (2020).** Novel human coronavirus (SARSCoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Vet Microbiol*, 244, 1-18.
- de Vries AAF, Horzinek MC, Rottier PJM, de Groot RJ (1997).** The Genome Organization of the Nidovirales: Similarities and Differences between Arteri-, Toro-, and Coronaviruses. *Semin Virol*, 8 (1), 33-47.
- Doğan F, Köse Sİ (2022).** Alt solunum yolu enfeksiyonu olan köpeklerde canine coronavirusun tespiti ve moleküler karakterizasyonu. *Vet Hek Der Derg*, 93 (2), 124-132.
- Dong B, Zhang X, Bai J et al. (2022).** Epidemiological investigation of canine coronavirus infection in Chinese domestic dogs: A systematic review and data synthesis. *Prev Vet Med*, 209, 105792.
- Gür S, Civelek T (2007).** Vaka Raporu: Bir köpek barınağında Kanin Koronavirus varlığının serolojik olarak araştırılması. *Eurasian J Vet Sci*, 21, 103-106.
- Gür S, Gençay A, Doğan N (2008).** A Serologic investigation for canine corona virus infection in individually reared dogs in central Anatolia. *J Fac Vet Med Univ Erziyes*, 5, 67-71.
- Haake C, Cook S, Pusterla N, Murphy B (2020).** Coronavirus infections in companion animals: virology, epidemiology, clinical and pathologic features. *Viruses*, 12 (9), 1023.
- Hall TA (1999).** BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*, 41, 95-98.
- He HJ, Zhang W, Liang J et al. (2020).** Etiology and genetic evolution of canine coronavirus circulating in five provinces of China, during 2018-2019. *Mic path*, 145, 104209.
- Herrewegh AA, Smeenk I, Horzinek MC, Rottier PJ, De Groot RJ (1998).** Feline coronavirus type II strains 79-1683 and 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol*, 72 (5), 4508-4514.
- Lai MMC, Holmes KV (2001).** Coronaviridae: the viruses and their replication. *Fields virology*. 4. Edition. Williams and Wilkins, Philadelphia: Lippincott.
- Lednický JA, Tagliamonte MS, White SK et al. (2022).** Isolation of a novel recombinant canine coronavirus from a visitor to Haiti: further

- evidence of transmission of coronaviruses of zoonotic origin to humans. *Clin Infect Dis*, 75 (1), e1184-e1187.
- Li N, Bai Y, Liu R et al. (2023).** Prevalence and genetic diversity of canine coronavirus in northeastern China during 2019–2021. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 94, 101956.
- Ozan E, Tamer C (2020).** Evcil hayvanların önemli coronavirus enfeksiyonları. *Avrasya Sağlık Bilim Derg*, 3, 102-110.
- Pratelli A, Tempesta M, Greco G, Martella V, Buonavoglia C (1999).** Development of a nested PCR assay for the detection of canine coronavirus. *J Virol Methods*, 80 (1), 11-15.
- Pratelli A, Martella V, Elia G et al. (2001).** Severe enteric disease in an animal shelter associated with dual infections by canine adenovirus type 1 and canine coronavirus. *J Vet Med*, 48, 385-392.
- Pratelli A, Martella V, Pistello M et al. (2003).** Identification of coronaviruses in dogs that segregate separately from the canine coronavirus genotype. *J Virol Methods*, 107 (2), 213-222.
- Pratelli A (2006).** Genetic evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. *Vet Res*, 37 (2), 191-200.
- Pratelli A, Tempesta M, Elia G et al. (2022).** The knotty biology of canine coronavirus: A worrying model of coronaviruses' danger. *Res Vet Sci*, 144, 190-195.
- Radford AD, Singleton DA, Jewell C, et al. (2021).** Outbreak of severe vomiting in dogs associated with a canine enteric coronavirus, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 27 (2), 517.
- Singhal T (2020).** A review of coronavirus disease-2019 (COVID-19). *Indian J Pediatr*; 87 (4), 281-286.
- Soma T, Ohinata T, Ishii H et al. (2011).** Detection and genotyping of canine coronavirus RNA in diarrheic dogs in Japan. *Res Vet Sci*, 90 (2), 205-207.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021).** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Mol Biol Evol*, 38, 3022-3027.
- Timurkan MO, Aydin H, Dincer E, Coskun N (2021).** Molecular characterization of canine coronaviruses: an enteric and pantropic approach. *Arch Viro*, 166 (1), 35-42.
- Tizard IR (2020).** Vaccination against coronaviruses in domestic animals. *Vaccine*, 38 (33), 5123-5130.
- Yeşilbağ K, Yılmaz Z, Torun S, Pratelli A (2004).** Canine coronavirus infection in Turkish dog population. *J Vet Med*, 51, 353-355.



Comparative Efficacy of the Dimethyl Sulfoxide, Glycerol and Methanol on the Post-Thaw Cell Viability of HeLa Cells

Zeyno NUHOĞLU ÖZTÜRK^{1,*} Orhan TOKUR¹ Abdurrahman AKSOY¹

¹Ondokuz Mayıs University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, 55200, Samsun, Türkiye

Received: 04.07.2023

Accepted: 04.12.2023

ABSTRACT

Cryoprotectants are used to protect cells during freezing. The concentration, type, and freeze-thaw conditions of these substances vary depending on the type of cell to be used. It is very important to determine the appropriate cryopreservation method for the particular cell. This study aims to provide insights into the optimal cryopreservation method for HeLa cells by comparing the performance of different cryoprotectants and evaluating their effectiveness under various freezing and storage conditions. Cell suspensions were frozen with a freezing media composed of cryoprotectant + fetal bovine serum + medium at a ratio of 5:10:85 (v:v:v) and stored under the following conditions: 3 months (-20 °C), 1 month (-80 °C), and 6 months (-80 °C). Cell viability and recovery rates were analyzed immediately post-thaw and after 48 h using the trypan blue dye exclusion assay. In 3 months (-20 °C), viability and recovery rates were higher in the methanol group. Glycerol showed better performance in 1 month (-80 °C). DMSO was the most efficient in 6 months (-80 °C). Methanol failed at -80 °C storage temperature. This study demonstrates the effect of these cryoprotectants in HeLa cells on cell viability and cell recovery rates immediately after thawing and after 48 hours of cultivation.

Keywords: Cell culture techniques, Cell survival, Cryopreservation, Freezing, HeLa cells.

ÖZ

Dimetil Sülfoksit, Gliserol ve Metanol'ün HeLa Hücrelerinin Çözdürme Sonrası Hücre Canlılığı Üzerindeki Karşılaştırmalı Etkinliği

Kriyoprotektanlar, hücrelerin dondurma işlemi sırasında korunması için kullanılır. Bu maddelerin, konsantrasyonu, tipi ve dondurma-çözdürme koşulları kullanılacak hücre tipine göre değişir. Uygun kriyoprezervasyon yönteminin hücreye özel olarak belirlenmesi oldukça önemlidir. Bu çalışma, farklı kriyoprotektanların performansını karşılaştırarak ve bunların çeşitli dondurma ve saklama koşulları altında etkinliğini değerlendirerek, HeLa hücreleri için en uygun kriyoprezervasyon yöntemine ilişkin bilgiler sağlanması amaçlanmaktadır. Hücre süspansiyonları 5:10:85 (v:v:v) oranında kriyoprotektan + fetal sıvır serumu + medyumdan oluşan bir dondurucu besiyerinde donduruldu ve 3 ay (-20 °C), 1 ay (-80 °C) ve 6 ay (-80 °C) koşullarında saklandı. Hücre canlılığı ve geri kazanım oranları, çözülmeden hemen sonra ve çözülme sonrası 48 saat sonra, tripan mavisi kullanılarak analiz edildi. Canlılık ve geri kazanım oranları 3 ay -20 °C'de, metanol grubunda daha yüksekti. Gliserol grubunda ise canlılık ve geri kazanım oranları 1 ay -80 °C'de daha iyi performans gösterdi. DMSO grubunda ise bu oranlar, 6 ay -80 °C'de en yüksekti. Metanol grubu -80 °C'deki depolama koşullarında başarısız oldu. Bu çalışma, HeLa hücrelerindeki bu kriyoprotektanların, çözdürme işleminden hemen sonra ve 48 saatlik kültüvasyondan sonra hücre canlılığı ve hücre geri kazanım oranları üzerindeki etkisini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Dondurarak saklama, Donma, HeLa hücreleri, Hücre kültürü teknikleri, Hücre yaşamı.

INTRODUCTION

Cryopreservation is preserving cells at low temperatures (-80 °C or -196 °C) for future use. This process should ensure post-thaw cell viability (Gupta et al. 2017), which could be affected by many variables, including cryoprotectant type and concentration, media and reagents' quality, freezing/thawing speed, storage length, and practitioner's experience (Baust et al. 2017). Among

these, cryoprotectants are considered indispensable for maintaining cell survival.

Cryoprotectants reduce ice crystal formation, which can puncture cell membranes and damage internal structures. They also help maintain cells' structural integrity and prevent cellular dehydration during freezing (Baust et al. 2011). Some cryoprotectant agents are dimethyl sulfoxide, propylene glycol, ethylene glycol, methanol, amino acids and oligosaccharides, amides, albumin, and

*Corresponding author: zeyno.nuhoglu@omu.edu.tr



polyvinylpyrrolidone (Elliott et al. 2017). Each has unique features, advantages and disadvantages. These are typically added to freezing media at concentrations between 5-20%, with the remaining usually composed of medium and fetal bovine serum (FBS) mixture (Baust et al. 2017). Although specific freezing/thawing protocols exist for most cell lines, the optimal cryoprotectant concentration that maximizes cell viability is still in debate. Moreover, external factors, such as storage temperature and length, impact cryoprotectants' activity (Gao et al. 2020). Therefore, investigations are needed to understand their efficiency under different conditions.

Herein, DMSO, glycerol and methanol were tested for their cryoprotective capabilities. HeLa cells were frozen with each agent and kept at -80°C for 1 and 6 months. Another set of HeLa cells was kept at -20°C for 3 months. Finally, viability/recovery scores were compared at the 0th and 48th hours post-thaw. The purpose of this study is to investigate and compare the cryoprotection efficacy of three different cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, glycerol, and methanol) on the HeLa cell line. Additionally, the study aims to investigate and identify the most efficient cryopreservation methods tailored to maintain the viability and functionality of HeLa cells under cryogenic conditions.

MATERIAL AND METHODS

Reagents and culturing conditions

Cervical cancer cell line, HeLa, and Eagle's Minimal Essential Medium (EMEM, with l-glutamine) were from the American Type Culture Collection (ATCC), USA. Heat-inactivated FBS was obtained from Gibco, USA. Trypsin-EDTA (0.05%), trypan blue (0.5%), sodium pyruvate, penicillin-streptomycin, and non-essential amino acids were from Biological Industries, USA. Analytical grade DMSO, methanol, and glycerol were from Sigma-Aldrich, Germany. Cells were cultured with EMEM media (10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, standard media) at 37°C , 5% CO_2 in a humidified incubator (EC 160, Nüve, Türkiye).

Freezing

ATCC procedures were employed for the freezing and thawing of HeLa cells (ATCC 2022). Cells were rinsed with PBS and detached by trypsin-EDTA solution. After centrifuging (1000 rpm, 10 mins), supernatant was discarded, and cells were counted using a hemocytometer. Finally, 2.5×10^5 live cells/mL in freezing media (Table 1) were portioned into cryovials. Then cells were equilibrated with freezing media for 15 mins. Cryovials were placed in a pre-cooled cryorack half-filled with ethanol. Cryorack was transferred into a polystyrene box to allow slow cooling. Finally, cells were either kept at -80°C for 1 and 6 months in a deep freezer (DF 490, Nüve, Türkiye) or -20°C for 3 months in a freezer (Bosch, Germany). Some cryovials were lost due to operational errors, and "N" numbers are shown in Table 2.

Table 1: Constituents of freezing media and culture

Cryoprotectant	Freezing media
DMSO	85% MEM + 10% FBS + 5% DMSO
Glycerol	85% MEM + 10% FBS + 5% Glycerin
Methanol	85% MEM + 10% FBS + 5% Methanol

Thawing

Cryovials were immediately placed into a water bath (NB20, Nüve, Türkiye) at 37°C for 2 mins. Cells were transferred into tubes containing 9 mL pre-warmed media and centrifuged (125 g, 10 mins). The supernatant was removed, and cells were resuspended in media. Cell viability and recovery rates were determined post-thaw 0th and 48th hours.

Trypan blue assay and viability/recovery calculation

Trypan blue assay was performed according to the method described by Murray and Gibson (2020). Briefly, 50 μL cell suspension and 50 μL trypan blue (0.5%) were mixed and vortexed. Then, 10 μL of the mixture was transferred to a hemocytometer, and dead/alive cells were counted with a light microscope (PrimoStar, Zeiss, Germany). The recovery rate and cell viability were calculated using Eq. 1.

Eq. 1: Cell viability % and recovery % calculation formulas

$$\text{Viability (\%)} = (\text{Viable cell count}) / (\text{Total post thaw cell count}) \times 100$$

$$\text{Recovery (\%)} = (\text{Viable cell count}) / (\text{Total frozen cell count}) \times 100$$

There is no standardized test to evaluate the effects of cryoprotectants on cell viability. However, two parameters, recovery and viability, are usually measured for the assessment (Weinberg et al. 2009). "Recovery" refers to the cell count that successfully grows in a new culture and considers the initial frozen cell count. "Viability", on the other hand, considers only post-thaw cell counts and does not consider any cells that may have been damaged during the freeze/thaw process. Therefore, recovery rates are regarded as a more accurate indicator of overall cell health, especially in evaluating cryoprotectant potency. Indeed, using the viability scores alone can lead to false positives (Murray and Gibson. 2020).

Statistical Analysis

The data were analyzed by GraphPad Prism 9.4 (San Diego, California, USA). Parametric data were compared by one-way ANOVA posthoc Tukey test with an alpha level of 0.05. Non-parametric data were analyzed by Kruskal-Wallis with Post-Hoc Mann-Whitney U tests using a Bonferroni-adjusted alpha level of 0.017 (0.05/3). Results were presented as mean \pm SEM.

Limitations

This study has some limitations. Cellular morphology and oxidative stress parameters were not investigated. Storage conditions were limited. Only one concentration of the cryoprotectant and FBS was tested. Only one cell line was tested.

RESULTS

This study tested the cryoprotective efficiency of DMSO, glycerol, and methanol on HeLa cells. Experiments were carried out at two different temperatures and three different periods because storage length and temperature are significant factors affecting long-term cell viability (Gao et al. 2020). Although liquid nitrogen (-196°C) is considered a well-settled approach for long-term cryopreservation, many laboratories still store their cells in a deep freezer at -80°C . Therefore, we tested -80°C storage temperature at 1 and 6 months. We also investigated whether cells may be viable after storing at -20°C at an ordinary freezer temperature (-20°C). Descriptive parameters are given in Table 2. Statistical comparisons of viability and recovery values are shown in Fig 1-3.

Table 2: Descriptive parameters of the DMSO, glycerol, and methanol groups.

	Group	N	Post-thaw	Mean	S.E.M.	Min.	Max.	Post-thaw	Mean	S.E.M.	Min.	Max.
1 month -80 °C	Viability	DMSO	14	73.75	2.98	50	87.5	48 th	90.99	3.14	66.67	100
		Glycerol	14	70.74		12.5	100		76.66	8.49	0	100
		Methanol	14	0 th	75.81	3.12	50		88.89	40.96	5.3	0
	Recovery	DMSO	14	54.85	7.63	8	120		52	7.62	16	128
		Glycerol	14	32.57	4.55	8	72		171.73	28.99	0	336
		Methanol	14	36.57	4.64	8	64		17.6	2.83	0	40
6 months -80 °C	Viability	DMSO	9	81.55	3.83	61.11	100	48 th	66.15	1.94	57.97	73.02
		Glycerol	14	85.9	1.55	75	95		60.81	3.54	31.58	82.76
		Methanol	15	0 th	42.89	5.99	11.11		100	37.82	3.55	20
	Recovery	DMSO	9	90.66	6.79	64	120		294.22	34.12	128	416
		Glycerol	14	108	12.68	48	232		124.57	18.18	40	280
		Methanol	15	23.46	2.86	8	48		19.33	2.5	8	32
3 months -20 °C	Viability	DMSO	13	80.2	2.86	50	94.74	48 th	47.58	3.99	25	66.67
		Glycerol	14	73.11	4.13	33.33	88.89		62.25	4.18	33.33	85.71
		Methanol	12	0 th	81.86	1.71	71.43		90.91	81.7	2.21	70
	Recovery	DMSO	13	90.67	11.47	16	160		33.85	2.59	16	48
		Glycerol	14	38.29	4.83	8	80		54.29	7.17	16	96
		Methanol	12	95.33	8.44	48	160		76	4.35	56	96

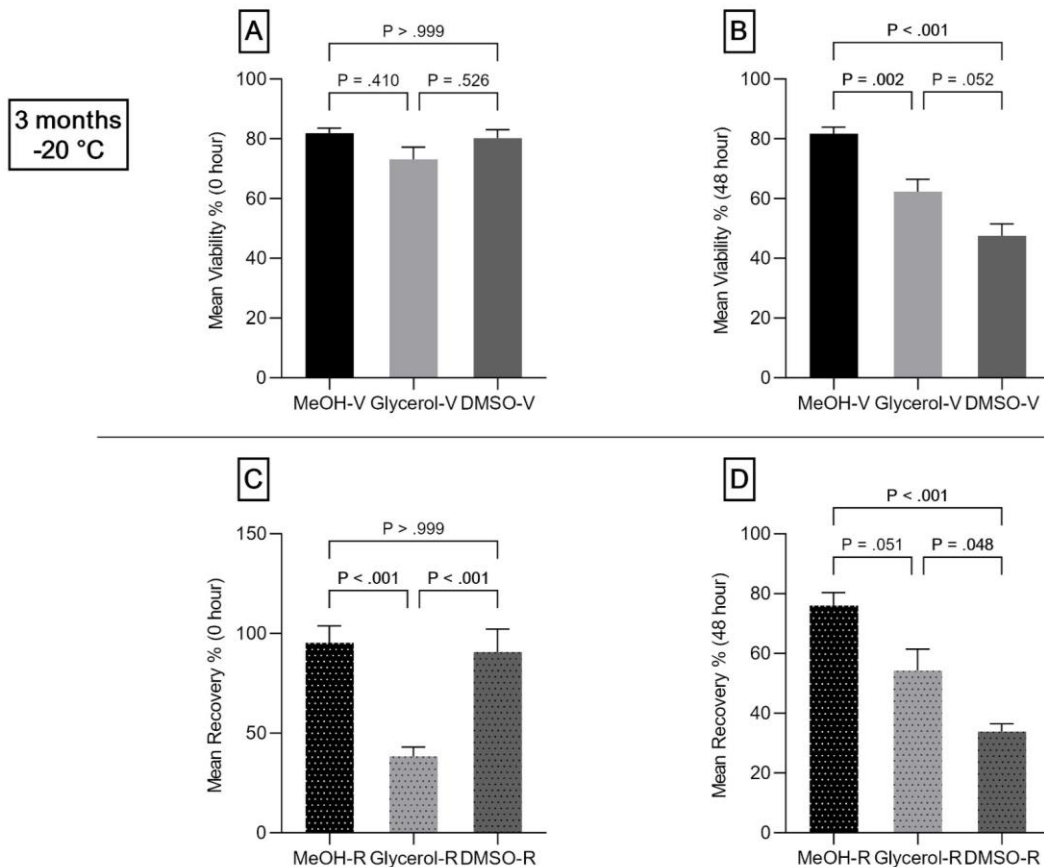


Figure 1: Comparison of DMSO, glycerol, and methanol groups stored at -20 °C for 3 months, A, B: Viability “V” (0, 48 h) C, D: Recovery “R” (0, 48 h).

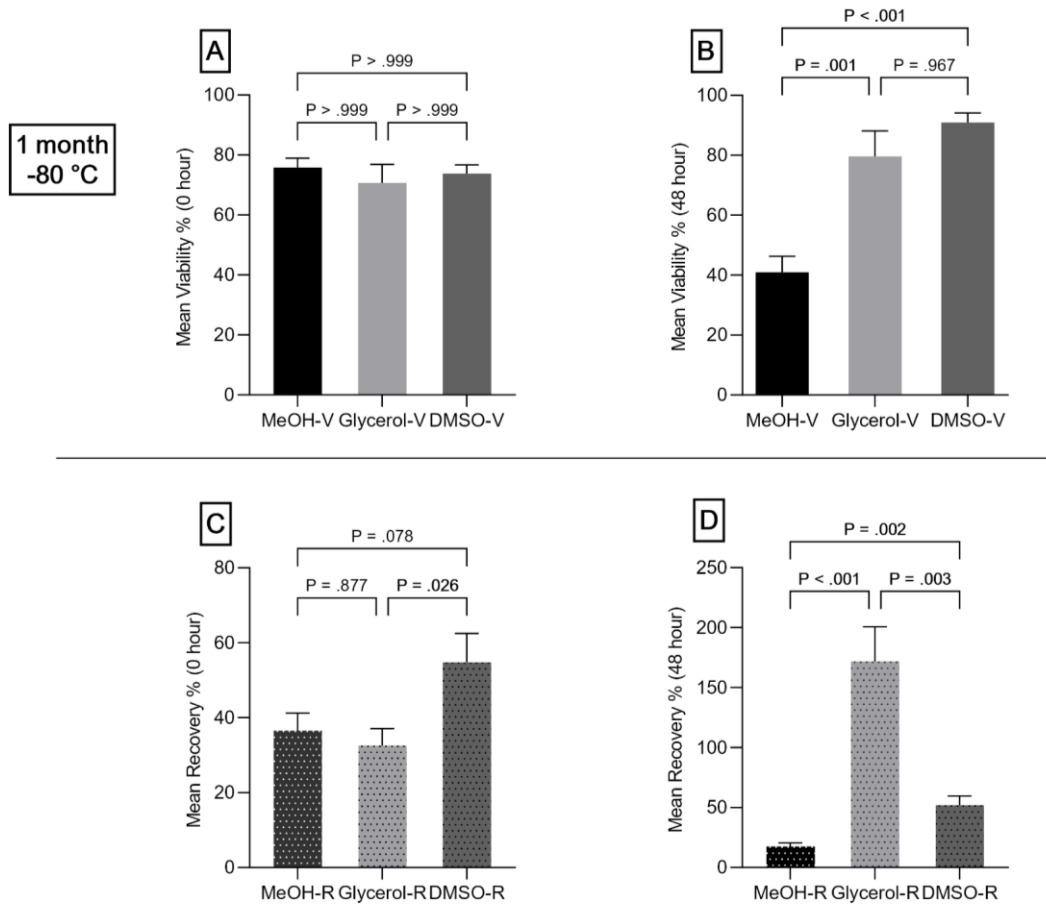


Figure 2: Comparison of DMSO, glycerol, and methanol groups stored at -80 °C for 1 month, A, B: Viability “V” (0, 48 h) C, D: Recovery “R” (0, 48 h).

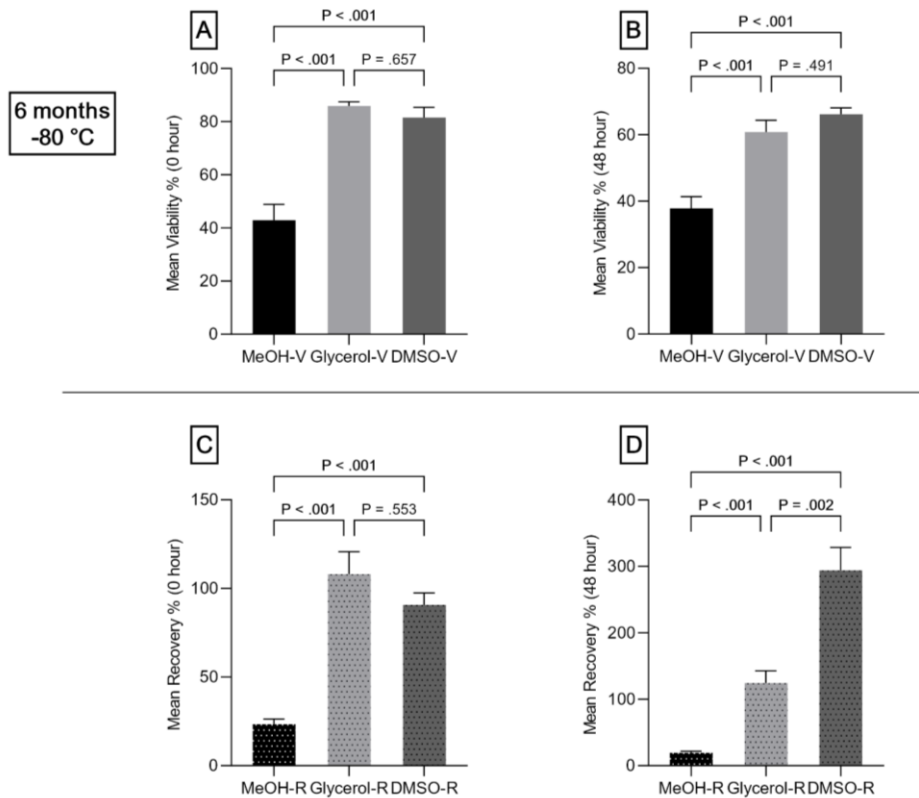


Figure 3: Comparison of DMSO, glycerol, and methanol groups stored at -80 °C for 6 months, A, B: Viability “V” (0, 48 h) C, D: Recovery “R” (0, 48 h).

Viability is the percentage of viable cells in a culture. The post-thaw 0th-hour viability was measured immediately after thawing. All cryoprotectants presented similar post-thaw 0th-hour viability. However, the damaged cells may lose their viability later in the culture; hence post-thaw 48th hour viability provides a better understanding of cryopreservation success. The impacts of the tested agents were significant at post-thaw 48th. For 1 and 6 months (at -80 °C), DMSO and glycerol provided better viability (Fig. 2-3), whereas for 3 months period, methanol was better (Fig. 1).

Recovery is the ratio of viable cell count to the initial frozen cell count. Therefore, it is considered a more accurate representation of overall cell health. Recovery results differed in storage conditions and measuring time (0-48 hours). Some principal findings considering post-thaw 48th-hour recoveries were as follows: For 1 month period (at -80 °C), glycerol was better (Fig. 2); for 6 months period (at -80 °C), DMSO was better (Fig. 3); for 3 months period (at -20 °C) glycerol and methanol were better (Fig. 1).

DISCUSSION AND CONCLUSION

As the temperature decreases during freezing, water separates purely, and the remaining solutes cause osmotic disturbance inside cells. Therefore, water passes through the plasma membrane to the outside of the cells in order to establish equilibrium (Baust et al. 2017). Free water molecules inside/outside the cells attach via hydrogen bonding and form ice crystals. When thawing, on the other hand, the leaked water molecules (as well as ice crystals) will rush into cells for the same reason. In both scenarios, osmotic imbalance (shrinking and swelling) and ice crystals cause considerable physical damage to the cells. Therefore, cells primarily die through necrosis when cryoprotectants are not used. Cryoprotectants inhibit ice crystal forming by binding/surrounding free water molecules and blocking their attachment. However, because these agents are solutes that can enter and out the cells, they may become another source of osmotic imbalance. When cryoprotectants are used, particularly at elevated levels, cells usually die through apoptosis triggered by osmotic stress (Baust et al. 2000). For this reason, the optimum cryoprotectant concentrations should be determined.

Various cryoprotectant agents were proposed, such as proline (Bryant et al. 2022), recombinant wheat proteins (Chow-Shi-Yee et al. 2020), and dextran-based hydrogels (Pereira et al. 2019); however, DMSO and glycerol are still widely preferred owing to well-established protocols and accessibility (Freshney 2015; Murray and Gibson 2022). These agents could protect non-sensitive cells such as HeLa without needing other supplies, but neuron-like sensitive cells require supplements such as FBS, albumin, sericin, and maltose (Gonzalez Porto et al. 2018; Yamatoya et al. 2022). FBS is a requirement in most cryopreservation protocols, yet it does not provide enough protection alone, as FBS at 100% concentration fails to protect cells from freezing damage (Fujisawa et al. 2019). On the other hand, the combination of FBS with cryoprotectant agents yields excellent viability (Reuther et al. 2006; Shinde et al. 2019). Cells preserved up to 95% FBS (with 5-10% DMSO) presented higher viability rates and maintained their cellular function (e.g., colony formation, differentiation) better than lower FBS levels (Stevenson et al. 2004; Fujisawa et al. 2019; Sevim and Arat 2021). Therefore, most laboratories utilize FBS in freezing media, usually at

10% concentration (Gomez-Lechon et al. 2006, Myagmarjav and Liu 2022), although some others avoid using FBS because of health concerns (Yamatoya et al. 2022). In this study, FBS concentration in freezing media remained constant at 10%.

In one month -80 °C period (Fig. 2), glycerol was superior to DMSO ($p=0.003$) in terms of recovery (post-thaw 48th), while viability was the same. Due to its lower toxicity, glycerol may allow cells to recover more quickly than DMSO, which can induce oxidative stress and be toxic to cells at concentrations >1% (Bumbat et al. 2020; Chow-Shi-Yee et al. 2020; Tamagawa et al. 2022). In 6 months -80 °C period, on the other hand, DMSO presented better recovery than glycerol ($p=0.002$) (Fig. 3), while viability was again the same. DMSO has higher intracellular permeability than glycerol (Vian and Higgins 2014; Myagmarjav and Liu 2022), and thus it may have protected cells more efficiently in long-term preservation. Although the glycerine and proline mixture was as effective as DMSO on four different cell lines (Bryant et al. 2022), cryopreservation with DMSO usually yields better outcomes. DMSO was effective in as low as 2% concentration when cryopreserving adult stem cells, even without FBS (Thirumala et al. 2010), while glycerol requires further concentrations. Glycerol successfully cryopreserved red blood cells at 15% (Poisson et al. 2019), although it caused toxicity on granulocytes at 30% concentration (Moss and Higgins 2016).

In summary, the study highlights that the choice of cryoprotectant should be based on the specific storage conditions and the intended duration of preservation. Glycerol appears to excel in short-term storage at -80 °C, while DMSO is more suitable for long-term storage at the same temperature. Methanol may have better in preserving cells for a limited time at -20 °C but is less effective in other scenarios. The success of the cryopreservation process is subject to variability, contingent upon numerous factors encompassing the conditions of cell culture, the composition of the growth media, the concentration and duration of trypsin application, the period during which cells are exposed to the external environment, and the selection and concentration of cryoprotective agents (Liu et al. 2021). Furthermore, the specific cell type being preserved constitutes a critical determinant influencing the outcomes of cryopreservation endeavors. In light of these multifaceted considerations, it is imperative that each step of the cryopreservation procedure is executed with meticulous care and precision, while the chosen freezing protocol should be systematically optimized, bearing in mind the distinct requisites associated with individual cell types (Elliott et al. 2017; Murray and Gibson 2020). Researchers may consider these findings when selecting cryoprotectants for their HeLa cell preservation needs, taking into account the desired storage duration and temperature conditions.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study was presented as an oral presentation at the congress named "II. International VII. National Veterinary Pharmacology and Toxicology Congress" and published as an abstract in the congress book.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: OT, ZNÖ
 Supervision / Consultancy: AA
 Data Collection and / or Processing: OT, ZNÖ
 Analysis and / or Interpretation: OT, ZNÖ
 Writing the Article: AA, OT, ZNÖ
 Critical Review: AA

REFERENCES

- ATCC (2022).** American Type Culture Collection Animal Cell Culture Guide. Date of access: 9 April 2023. Access address: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide>.
- Baust JG, Corwin WL, Baust JM (2011).** Cell Preservation Technology. Moo-Young M (Ed). *Comprehensive Biotechnology* (pp. 179-190). Elsevier BV.
- Baust JM, Campbell LH, Harbell JW (2017).** Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell Dev-An*, 53 (10), 855-871.
- Baust JM, Van B, Baust JG (2000).** Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cell Dev-An*, 36 (4), 262-270.
- Bryant SJ, Awad MN, Elbourne A et al. (2022).** Deep eutectic solvents as cryoprotective agents for mammalian cells. *J Mater Chem B*, 10 (24), 4546-4560.
- Bumbat M, Wang M, Liang W et al. (2020).** Effects of Me(2)SO and Trehalose on the Cell Viability, Proliferation, and Bcl-2 Family Gene (BCL-2, BAX, and BAD) Expression in Cryopreserved Human Breast Cancer Cells. *Biopreserv Biobank*, 18 (1), 33-40.
- Chow-Shi-Yee M, Grondin M, Ouellet F, Averill-Bates DA (2020).** Control of stress-induced apoptosis by freezing tolerance-associated wheat proteins during cryopreservation of rat hepatocytes. *Cell Stress Chaperones*, 25 (6), 869-886.
- Elliott GD, Wang SP, Fuller BJ (2017).** Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, 74-91.
- Freshney RI. (2015).** Cryopreservation. Freshney RI (Ed). *Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications* (pp. 317-334). John Wiley & Sons, Inc.
- Fujisawa R, Mizuno M, Katano H et al. (2019).** Cryopreservation in 95% serum with 5% DMSO maintains colony formation and chondrogenic abilities in human synovial mesenchymal stem cells. *BMC Musculoskelet Disord*, 20 (1), 316.
- Gao S, Ogawa M, Takami A et al. (2020).** Practical and Safe Method of Long-term Cryopreservation for Clinical Application of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Without a Programmable Freezer or Serum. *Cryoletters*, 41 (6), 337-343.
- Gomez-Lechon MJ, Lahoz A, Jimenez N, Castell JV, Donato MT (2006).** Cryopreservation of rat, dog and human hepatocytes: influence of preculture and cryoprotectants on recovery, cytochrome P450 activities and induction upon thawing. *Xenobiotica*, 36 (6), 457-472.
- Gonzalez Porto SA, Domenech N, Gonzalez Rodriguez A et al. (2018).** The addition of albumin improves Schwann cells viability in nerve cryopreservation. *Cell Tissue Bank*, 19 (4), 507-517.
- Gupta V, Sengupta M, Prakash J, Tripathy BC (2017).** Animal cell culture and cryopreservation. Gupta V (Ed). *Basic and Applied Aspects of Biotechnology*. (pp. 59-75) Singapore, Springer.
- Moss AC, Higgins AZ (2016).** Investigating the potential for cryopreservation of human granulocytes with concentrated glycerol. *Cryobiology*, 72 (3), 290-293.
- Murray KA, Gibson MI (2020).** Post-Thaw Culture and Measurement of Total Cell Recovery Is Crucial in the Evaluation of New Macromolecular Cryoprotectants. *Biomacromolecules*, 21 (7), 2864-2873.
- Murray KA, Gibson MI (2022).** Chemical approaches to cryopreservation. *Nat Rev Chem*, 6 (8), 579-593.
- Myagmarjav B, Liu B (2022).** Cryopreservation of HEP-G2 cells attached to substrates: the benefit of sucrose and trehalose in combination with dimethyl sulfoxide. *Cryoletters*, 43 (3), 175-182.
- Pereira J, Ferraretto X, Patrat C, Meddahi-Pelle A (2019).** Dextran-Based Hydrogel as a New Tool for BALB/c 3T3 Cell Cryopreservation Without Dimethyl Sulfoxide. *Biopreserv Biobank*, 17 (1), 2-10.
- Poisson JS, Acker JP, Briard JG, Meyer JE, Ben RN (2019).** Modulating Intracellular Ice Growth with Cell-Permeating Small-Molecule Ice Recrystallization Inhibitors. *Langmuir*, 35 (23), 7452-7458.
- Reuther T, Kettmann C, Scheer M et al. (2006).** Cryopreservation of osteoblast-like cells: viability and differentiation with replacement of fetal bovine serum in vitro. *Cells Tissues Organs*, 183 (1), 32-40.
- Sevim ET, Arat S (2021).** Combining dimethyl sulphoxide (DMSO) with different cryoprotectants ensures better cartilage cell cryopreservation. *Cryoletters*, 42 (4), 220-226.
- Shinde P, Khan N, Melinkeri S, Kale V, Limaye L. (2019).** Freezing of dendritic cells with trehalose as an additive in the conventional freezing medium results in improved recovery after cryopreservation. *Transfusion*, 59 (2), 686-696.
- Stevenson DJ, Morgan C, Goldie E, Connel G (2004).** Cryopreservation of viable hepatocyte monolayers in cryoprotectant media with high serum content: metabolism of testosterone and kaempferol post-cryopreservation. *Cryobiology*, 49 (2), 97-113.
- Tamagawa S, Sakai D, Schol J et al. (2022).** N-acetylcysteine attenuates oxidative stress-mediated cell viability loss induced by dimethyl sulfoxide in cryopreservation of human nucleus pulposus cells: A potential solution for mass production. *JOR spine*, 5 (4), e1223.
- Thirumala S, Gimble JM, Devireddy RV (2010).** Evaluation of Methylcellulose and Dimethyl Sulfoxide as the Cryoprotectants in a Serum-Free Freezing Media for Cryopreservation of Adipose-Derived Adult Stem Cells. *Stem Cells Dev*, 19 (4), 513-522.
- Vian AM, Higgins AZ (2014).** Membrane permeability of the human granulocyte to water, dimethyl sulfoxide, glycerol, propylene glycol and ethylene glycol. *Cryobiology*, 68 (1), 35-42.
- Weinberg A, Song LY, Wilkening C et al. (2009).** Optimization and limitations of use of cryopreserved peripheral blood mononuclear cells for functional and phenotypic T-cell characterization. *Clin Vaccine Immunol*, 16 (8), 1176-1186.
- Liu X, Pan Y, Liu F et al. (2021).** A review of the material characteristics, antifreeze mechanisms, and applications of cryoprotectants (CPAs). *J Nanomater*, 1-14.
- Yamatoya K, Nagai Y, Teramoto N et al. (2022).** Cryopreservation of undifferentiated and differentiated human neuronal cells. *Regen Ther*, 19, 58-68.



Kedi ve Köpeklerde Obezitenin Hayvan Sahiplerinin Profilleri ile Birlikte Değerlendirilmesi

İzzet Emin DEMİR¹ Selçuk ALTAÇLI^{2,*} ¹Yaman Veteriner Eczacı Deposu, 34524, İstanbul, Türkiye²Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 65040, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 12.09.2023

Kabul Tarihi: 25.01.2024

ÖZ

Obezite kedi ve köpekler için günümüzde yaygın olarak seyreden hem metabolizma hem de beslenme bozukluğudur. Obeziteyle bağlantılı olarak kedi ve köpeklerde diabetes mellitus, kardiyovasküler sistemi hastalıkları, kas-iskelet sistemi hastalıkları ve hatta morbidite gibi ciddi ve geri dönüşü olmayan sorunlar gelişebilir. Bu çalışmayla ülkemizde de kedi ve köpek obezitesi ile kedi-köpek sahiplerinin bakım ve besleme davranışları arasındaki bağlantıların verilerinin anket yoluyla elde edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya katılım sağlayan 1135 katılımcıdan elde edilen verilere dayanılarak ülkemizde kedilerin %42'sinin, köpeklerin ise %30'unun aşırı kilolu ve obez oldukları belirlenmiştir. 1079 hayvan sahibinin obezitenin kedi ve köpekler için bir hastalık olduğunun farkında olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmayla ülkemizdeki kedi ve köpek sahiplerinin %8'inin vejetaryen, %61'inin vegan olduğu da tespit edilmiştir. Kedi ve köpeklerin vejetaryen beslenmesini uygun bulmayan hayvan sahiplerinin oranının %66, vegan beslenmesini uygun bulmayanların oranının ise %64 olduğu da önemli bir veri olarak çalışma sonunda ortaya çıkmıştır. Sonuç olarak bu araştırmanın sonucunda elde edilen verilerin ülkemizde açığı bulunan kedi ve köpek obezitesiyle ilgili literatüre kaynak sağlaması ve kedi-köpek obezitesine yönelik çalışmalara az da olsa katkı sunması umut edilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Besleme, Kedi, Köpek, Obezite, Vegan, Vejetaryen.

ABSTRACT

Evaluation of Obesity in Cats and Dogs together with the Profiles of Pet Owners

Today, obesity is both a metabolism and a nutritional disorder that is common in cats and dogs. In connection with obesity, serious and irreversible problems such as diabetes mellitus, cardiovascular system diseases, musculoskeletal system diseases and even morbidity may develop in cats and dogs. The aim of the study was to obtain the data of the correlations between cat and dog obesity and the care and feeding behaviors of cat and dog owners in our country, by means of a questionnaire. Based on the data obtained from 1135 participants who participated in the study, it was determined that 42% of cats and 30% of dogs in our country were overweight and obese. It was determined that 1079 pet owners were aware that obesity is a disease for cats and dogs. In addition, this study found that 8% of cat and dog owners in our country are vegetarian and 61% are vegan. As an important data, it was revealed at the end of the study that the rate of pet owners who do not find vegetarian nutrition suitable for cats and dogs is 66%, and the rate of those who do not find vegan nutrition appropriate is 64%. As a result, it is hoped that the data obtained from of this research will provide a source for the literature on cat and dog obesity, which is lacking in our country, and contribute a little to studies on cat and dog obesity.

Keywords: Cat, Dog, Obesity, Nutrition, Vegan, Vegetarian.

GİRİŞ

Vahşi kedi ve köpekler doğada kendi besin maddesi ihtiyaçlarını peşlerinde koştıkları avlarından sağlamaya çalışırken, vücutlarının gereksinim duyduğu enerjiyle vücutları arasında bir denge sağlamaya çalışıyorlardı. Evcilleştirilmeye çalışılan ve/veya evcilleştirilmiş diğer

hayvanlarda olduğu gibi kedi ve köpeklerde evcilleştirildikten sonra insanların onlara uygun gördüğü şartlarda yaşamaya ve onlara uygun gördükleri besin maddeleriyle beslenmeye deyim yerindeyse insanoğlunun merhametine mahkûm olmuşlardır.

Kedi-köpeklerin evcilleştirilmeleriyle birlikte yaşam şekillerinde ve konforlarında da olumlu ve olumsuz gelişmeler meydana gelmiştir. Kedi ve köpeklerin insanlar



tarafından korunma altına alındıkları zamandan bu yana vahşi yaşamda karşı karşıya oldukları tehlikeler nispeten azalmış, yeme içmeye erişimleri kolaylaşmıştır. Böyle olunca hem kediler hem de köpeklerde beklenen yaşam süresi uzarken, hareket alanları kısıtlanmış, beslenme şekilleri ve vahşi yaşamda sergilemiş oldukları davranışlar değişmiştir. Nihayet bu hayvanların doğal ortamlarına göre daha rahat bir yaşama alışmaları sonucu, günümüz insanların karşı karşıya kalmış olduğu diabetes mellitus, kanser, obezite, kardiyovasküler hastalıklar vb. rahatsızlıklar kedi ve köpeklerde de görülmeye başlamıştır (German 2006).

Günümüz kedi ve köpek metabolik ve beslenme hastalıklarının başında obezite gelmektedir. Kısa ve basit bir tanımı yapılacak olursa, obezite kısaca vücudun yağ depolama bölgelerinde aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanmaktadır (Russell ve ark. 2000; German 2006; Toll ve ark. 2010; Case ve ark. 2011; Eteke 2012; Larsen ve Della Maggiore 2020). Biriken yağ vücut ağırlığını artırır; bu nedenle, aşırı vücut yağıyla aşırı kilo birbiriyle ilişki halindedir (Toll ve ark. 2010). İdeal ağırlıklarının %10-19'undan fazla kiloya sahip olan kedi-köpekler fazla kilolu, %20 veya daha fazla kiloya sahip olanlar ise obez olarak değerlendirilirler (Case ve ark. 2011; Wortinger ve Burns 2015). Erişkin köpeklerde adipoz hücrelerde depolanan ve bu hücrelerin hacimce büyümelerine neden olan yağ hipertrofik obezite olarak tanımlanırken, aşırı beslenen büyüme dönemindeki köpeklerin adipoz hücrelerinde yaşlı hayvanlardan farklı olarak sayıca artan yağ ise hiperplastik obezite olarak tanımlanmaktadır (Kahraman 2007).

Obezite günümüzde kedi ve köpeklerin bir numaralı beslenme problemi haline gelmiştir (Verbrugghe 2019). Kedi-köpek obezitesinin dünyada Kuzey Amerika'da (özellikle ABD'de) ve ileri sanayi ülkelerinde insan obezitesine denk bir düzeyde bulunduğu bildirilmektedir (Wortinger ve Burns 2015). Kedilerin %63'ünün ve köpeklerin %59'unun fazla kilolu veya obez oldukları bildirilen çeşitli araştırma sonuçları bulunmaktadır (Courcier ve ark. 2010; Larsen ve Della Maggiore 2020). Türkiye'de kedi köpek obezitesinin görülme sıklığına dair bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Obezite pek çok faktörün bir araya gelerek etkili olduğu bir durumdur. Birçok risk faktörü, enerji tüketimini ve enerji kullanımını etkileyerek pozitif bir enerji dengesi oluşturmaktadır (German 2006; Laflamme 2006). Obezite vakalarının yalnızca %3'ünün hayvanlara özgü faktörlere bağlı olduğuna inanılırken, %97'sinin beslenme faktörleri, fiziksel aktivite ve hayvan sahiplerinin tutumları gibi insana özgü faktörlerden kaynaklandığına inanılmaktadır (Bland ve ark. 2010).

Kedi ve köpeklerde obeziteyle ilişkili faktörler primer obezite ve sekonder obezite diye iki kısma ayrılarak da incelenebilir (Larsen ve Della Maggiore 2020).

Primer obezitenin olası oluşma nedenleri arasında: Aşırı kalori tüketimi (yoğun enerji içeren gıdalar, hayvanın doğasına uygun olmayan yemleme uygulamaları, yetersiz besleme uygulamaları, ad libitum besleme), enerji harcanmasının azaltılması veya engellenmesi (yetersiz hareketlilik ve egzersiz), büyüme oranı, yaş, hayvanın kısırlaştırılması durumu, hayvan sahibinin geliri, yaşı ve vücut kompozisyonu, genetik yatkınlık (ırk) sayılabilir (Larsen ve Della Maggiore 2020)

Sekonder obezitenin olası oluşma nedenleri arasında ise: Hipertiroidizm, hiperadrenokortisizm, hiperinsülinizm, akromegali, hipotalamusun görevini yerine getirmesinde

yetersizlik, glukokortikoid, progeatagen, fenobarbital ve primidon gibi ilaç uygulamaları sayılabilir.

Risk faktörlerinin bazılarını hayvana bağlı faktörler ve insana bağlı faktörler başlıkları altında incelememiz mümkündür (Bland ve ark. 2010).

Hayvana bağlı faktörler arasında ırk ve yaş, cinsiyet ve kısırlaştırma sayılabilir. Obezitenin gelişimiyle ilgili olarak bazı kedi ve köpek ırklarının yatkın olduğu bildirilmektedir (Verbrugghe 2019). Obezite gelişme riski yüksek kedi ırkları arasında başta melez ırklar olmak üzere Manx, İngiliz kısa tüylü kedisi, Norveç orman kedisi, İran kedisi, evcil kısa, orta ve uzun tüylü kedi ırkları bulunurken, köpek ırkları arasında Labrador Retriever, Golden Retriever, Rottweiler, Cocker Spaniel, Collie, Dachshund, Cairn Terrier, Shetland Sheepdog, Beagle, Cavalier King Charles Spaniel, Basset Hound gibi ırklar bulunmaktadır (Verbrugghe 2019; Larsen ve Della Maggiore 2020).

Obezite prevalansı hayvanın yaşının ilerlemesiyle birlikte artarken, özellikle fiziksel aktivitenin azalmasına bağlı olarak aynı şekilde azalan enerji ihtiyaçları ve yaşa bağlı vücut kompozisyonunda meydana gelen değişiklikler bazal metabolizma hızının düşmesine neden olmaktadır (Verbrugghe 2019). Obezite en çok orta yaşlı yetişkin köpek ve kedilerde görülmektedir (Case ve ark. 2011). Erişkin köpek ve kedilerin %35-40'ı ve 7 yaş ve üzeri köpek ve kedilerin ise %50'den fazlasının obez olduğu tahmini yapılmaktadır (Case ve ark. 2011; Ergün ve ark. 2013; Wortinger ve Burns 2015; Küçük 2020).

Çocuk obezitesinde olduğu gibi, yavru köpeklik dönemindeki aşırı kilonun, köpekleri yetişkin obezitesine yatkın hale getirdiği ve 9 ila 12 aylık obez dişilerin, obez olma olasılığının 1.5 kat daha fazla olduğu, genç kedilerde kısırlaştırmayı takiben benzer bir kilo alımı olgusunun meydana geldiği ve bu durumun hayvanları obeziteye yatkın hale getirdiği bildirilmektedir (Zoran 2010).

Evde bakılan köpek ve kedilerin birçoğu sahipleri tarafından kısırlaştırılmaktadır. Veteriner hekimler pet hayvan sahiplerine hayvanlarını cinsel olgunluğa erişmeden önce kısırlaştırmalarını tavsiye etmekte, sonuç olarak birçok kedi ve köpek 6 ay ile 1 yaş arasında kısırlaştırılmaktadır. Bu süre hayvanın aktivite düzeyinde ve enerji ihtiyacındaki azalmaya sebep olduğu için hayvan sahipleri bu durumun farkına varmazlar ve hayvanlarını kısırlaştırmadan önceki mama miktarıyla beslemeye devam ederek aşırı kilo almına sebep olurlar (Case ve ark. 2011). Kısırlaştırma ve obezite arasında önemli bir ilişki bulunmaktadır ve kısırlaştırılan kedi ve köpeklerde aşırı kilolu olma durumunun giderek daha sık görüldüğü bildirilmiştir (Case ve ark. 2011; Verbrugghe 2019). Normal emsallerine göre kısırlaştırılmış köpeklerin 2.8 kat (Robertson 2003), kısırlaştırılmış kedilerin 3.6 kat (Courcier ve ark. 2012) daha fazla kilolu olma olasılığı bulunmaktadır.

Kedi ve köpek obezite oluşumunda insana bağlı faktörler arasında: Diyet ve besleme (Son derece lezzetli, enerji açısından yoğun yiyecekler, özellikle özgürce beslendiklerinde kedi ve köpekleri kilo alma riskine sokar) (Verbrugghe 2019) ve fiziksel aktivite (özellikle düşük fiziksel aktivite düzeyleri enerji seviyesini azalttığı için egzersiz eksikliği de önemli bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır) sayılabilir (Verbrugghe 2019).

Obezite sadece büyük miktarlarda yağ dokusunun birikmesiyle değil, aynı zamanda vücutta meydana gelen önemli metabolik ve hormonal değişikliklerle de alakalıdır (Zoran 2010). Obezitenin kanıtlanmış olası olumsuz etkileri arasında (Zoran 2010; Larsen ve Della Maggiore

2020): yaşam süresinde kısılma, osteoartrit ve intervertebral disk hastalığı dahil olmak üzere ortopedik hastalıkların şiddetlenmesi, kardiyopulmoner disfonksiyon, bozulmuş akciğer uyumu, Pickwickian sendromu (obezite hipoventilasyon sendromu), egzersiz ve sıcaklığa karşı tahammülsüzlük, insülin direnci ve diyabete yatkınlık, hiperlipidemi, hepatik lipidoz (kediler), pankreatitise yatkın olma, kabızlıkla ilgili problemler, kedi alt üriner sistem hastalığına yatkınlık, kısırlaştırılmış dişi köpeklerde idrar kaçırma eğilimi, üreme problemlerine yatkınlık, güç doğum (distosi), sebore, piyoderma gibi cilt problemlerine yatkınlık, cerrahi ve anestezi risk artışı gibi faktörleri saymak mümkündür.

Tüketilen enerji ile harcanan enerji arasındaki dengesizlik ve bunun sonucu olarak sürekli bir enerji fazlalığının olması obezitenin altında yatan temel faktördür. Günümüzde evde beslenen kedi ve köpekler kısırlaştırılmaktadır. Kısırlaştırmanın sağlıklı ilişkili pek çok faydaları bulunurken bazı önemli metabolik etkileri de ortaya çıkmaktadır. Kısırlaştırma metabolik hızda azalmaya, yem tüketiminde artmaya neden olmaktadır (Ergün ve ark. 2013).

Enerji tüketimi ayarlanmaz ise ağırlık artışı, vücut kondüsyon skorunda artış ve vücut yağlarında artış nedeniyle hayvanlarda aşırı kilo veya obeziteye neden olmaktadır. Kısırlaştırma ile her iki cinsiyette de obezite gelişir. Bu durum kısırlaştırmayı takiben enerji harcanmasının azalmasının sonucu olabilir. Ancak bu duruma daha çok östrojen ya da testosteron hormon kaybının neden olduğuna inanılmaktadır (Ergün ve ark. 2013).

Kedi ve köpeklerin optimal vücut kondisyonunda olup olmadıklarını değerlendirmenin çeşitli yöntemleri bulunmaktadır (German 2006). Bu yöntemlerin başlıcaları arasında kimyasal analizler, dansitometri, izotop seyreltme, absorpsiyometri, ultrason, vücut ağırlığı ölçümü, vücut kondisyon skoru, magnetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi sayılabilir. Kedi-köpek kliniğinde en sık kullanılan teknikler arasında, vücut ağırlığının ölçülmesi ve vücut kondisyon skorunun (VKS) belirlenmesi bulunmaktadır (Larsen ve Della Maggiore 2020).

VKS, bir hayvanın vücut yağının, hayvanın ağırlığından bağımsız olarak beden boyutunu hesaba katan özel bir değerlendirmedir (Wortinger ve Burns 2015). VKS'nin belirlenmesi için 5, 9, 6, 11 ve hatta 17 puanlık (Russell ve ark. 2000) ölçekler geliştirilmiştir. En fazla kullanılan VKS değerlendirme sistemlerinden 5 puanlık sistemde 1 zayıf, 3 ideal ve 5 aşırı obez iken; 9 puanlık sistemde ise 1 zayıf, 5 ideal ve 9 aşırı obez olarak değerlendirilmektedir. (Bjornvad ve Buelund 2019).

Obezite tedavisinin kısa dönemli hedefi, vücut yağı depolarını azaltmaya yoğunlaşmak olmalıdır. Bunu sağlamanın yolu negatif enerji dengesinin uyarılmasıdır. Negatif enerji dengesi; mama tüketimini kısıtlayarak toplam enerji harcamasını aktif hale getirerek veya her ikisini kombine halde kullanarak sağlanabilir.

Tedavinin uzun dönemli hedefi hayvanın ideal vücut ağırlığına ve kondisyonuna ulaşması ve bunu hayatının geri kalanında korumasını sağlamak olmalıdır. Ancak bunların süreklilik arz etmesini sağlamak için pet hayvan sahibinin iş birliği yapması (hayvan besleme konusunda bilgisinin olması, uzmanın tavsiyelerine uyması vb.), hayvanına uygun bir egzersiz programı planlayarak bu programı devam ettirmesi ve uygun bir diyet değişikliğinin

olması gerekmektedir. Diyet değişikliği ve egzersiz, kilo kaybına neden olacak bir enerji açığı oluşturacaktır (Case ve ark. 2011). Obeziteden koruma tedaviden daha kolay ve önemlidir. Obeziteden korunma için doğru türde ve miktarda gıda alımının sağlanması, canlı ağırlık kontrolünün yapılması, muayene ve hayvana egzersiz yaptırma gibi önemli dört temel başlık sayılabilir (Kahraman 2007).

Bu çalışmayla özellikle son yıllarda hem insanlarda hem de kedi-köpeklerde trend haline gelen hastalıklardan biri olan obezitenin ülkemizde rastlanma sıklığının hayvan sahiplerinin profilleriyle bağlantısının ne olduğu hakkında veriler elde etmek, elde edilecek verilerin daha sonra obezite hakkında yapılması düşünülecek daha detaylı çalışmalara (hem kedi-köpek hem de insan araştırmaları) altyapı oluşturmasını sağlamak, böylece kedi ve köpeklerin daha sağlıklı beslenmesine ve obezite gibi hastalıkların en azından ortaya çıkma sıklığının azaltılmasına katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma faaliyetinin etik kurul denetimine tabi olmadığı Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulunca belirtilmiştir. Tarih: 24/06/2021; Karar No: 2021/06-08.

Anket çalışması gelişen teknolojiye de faydalanarak hem insanlara daha rahat ulaşabilmek hem de kağıt, mürekkep, iş gücü vb. 'den tasarruf etme adına online olarak çoktan seçmeli şıklardan, açık uçlu sorulardan ve "evet" veya "hayır" olarak belirtilebilecek sorulardan oluşacak şekilde yapılmıştır. Dünya üzerinde farklı online anket programları ve uygulamaları kullanılsa da dünya'da ve Türkiye'de yaygın olarak kullanılan Google anket çalışması bu çalışmaya uyarlandı.

Yapılan anket çalışmasında isim, soy isim gibi kişisel bilgiler kesinlikle istenilmemiş ayrıca cevap verilmek istenmemesi gibi durumlar göz önünde bulundurularak çoktan seçmeli soruların şıkları arasına "Belirtmek istemiyorum" şeklinde bir seçenekte eklenmiştir. Ankete katılım için bir zaman aralığı (2 ay) belirlenmiştir. Bu sürenin bitiminden sonra ankete erişim sonlandırılarak yeni verilerin girilmesi engellenmiştir. Böylece anket sorularına cevap vererek geri dönüş sağlayan toplam hayvan sever sayısı 1135 kişi olmuştur.

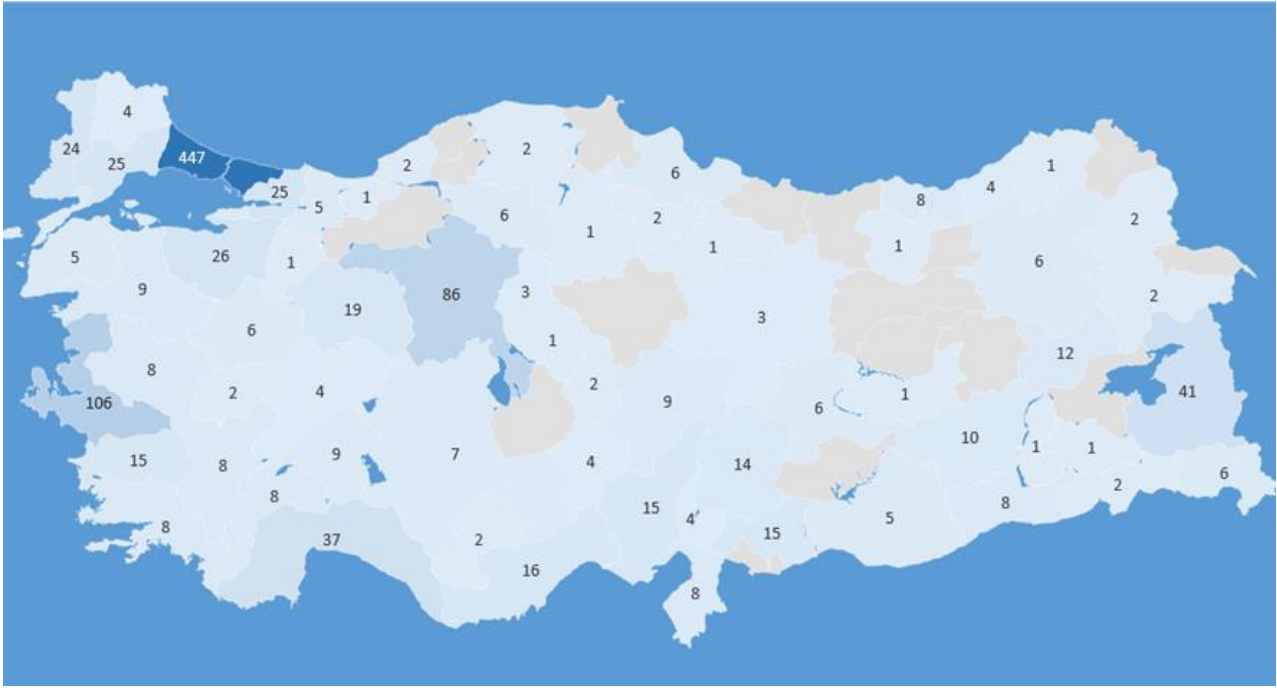
İstatistik Analiz

Elde edilen verilerin analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 26 paket programından yararlanılmıştır. Kategorik değişkenler için ki-kare (χ^2) testi uygulanmıştır. Anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmıştır. Tanımlayıcı istatistikler frekans ve % olarak verilmiştir. Uygulanan istatistik analizinin güvensiz olması durumunda diğer ilgili testlere başvurulmuştur (MacDonald ve Gardner 2000).

BULGULAR

Ankete Katılan Kedi ve Köpek Sahiplerinin Katılım Sağladıkları Şehirlerle İlgili Veriler

Ankete katılım sağlayanların buldukları şehirlerin dağılımlarını gösteren harita Şekil 1'de gösterilmiştir. Harita incelendiğinde anket çalışmasına en büyük katılımın İstanbul (447 kişi)'dan olduğu, İstanbul'u sırasıyla 106 kişi ile İzmir, 86 kişi ile Ankara ve 41 kişi ile Van takip etmektedir.



Şekil 1: Katılımcıların buldukları şehirleri gösteren harita.

Figure 1: Map showing the cities where the participants are located.

Kedi ve Köpek Sahiplerinin Vejetaryenlik/Veganlık, Vejetaryen/Vegan Beslenme Hakkındaki Görüşlerine Yönelik Veriler

Hayvan sahiplerinin yaşam tarzları, hayata bakış açıları, inançlar vb. nedenlerden dolayı günümüzde sahip oldukları kedi ve köpekler hatta diğer pet hayvanlarına (örneğin egzotik süs kuşları) kendi yedikleri içtikleri besinleri verme eğiliminde olmalarından dolayı anket çalışmasına konulan vejetaryen ve veganlıkla alakalı sorularla hem insanların hem de kedi ve köpeklerin beslenmesi hakkında bilgi edinilmesi amaçlanmıştır. Kedi ve köpek sahiplerinin vegan ve/veya vejetaryen olup olmadığını belirlemeye yönelik soruya verdikleri cevapların dağılımı Tablo 1'de ve vejetaryen ve/veya vegan beslenme hakkındaki düşüncelerini belirlemeye yönelik sorulan anket sorusuna verilen cevapların dağılımı ise Tablo 2'de görülmektedir.

Vejetaryenlik ve veganlıkla ilgili olarak kedi ve köpek sahiplerinden 899 (%79) 'unun vejetaryen olmadığı, 88 (%8)'inin olmayı düşündüğü, 58 (%5)'inin daha önce vejetaryen olmayı deneyip sonradan bıraktığı, 90 (%8)'inin ise vejetaryen olduğu tespit edilmiştir. Veganlıkta ise bu oranlar daha düşük çıkmıştır. Vegan mısınız sorusuna evet cevabını verenlerin sayısı 34 (%3), hayır cevabını verenlerin sayısı ise 1008 (%89), vegan olmayı deneyip sonradan bırakanların sayısı 32 (%3), vegan olmayı düşünenlerin sayısı ise 61 (%5) olarak bulunmuştur. Kedi ve köpeklerini vejetaryen veya vegan olarak besleme konusunda ise kedi ve köpek sahiplerinin büyük çoğunluğu her iki beslenme şeklini uygun bulmamıştır (Tablo 2).

Vejetaryen beslenmeyi uygun bulmayanların oranı %66 (745 kişi) iken, vegan beslenmeyi uygun bulmayanların oranı ise %64 (726) iken, kedi ve köpeklerini her iki beslenme şekli (vejetaryen/vegan) ile besleme konusunda kararsız kalanların oranı %23 olmuştur.

Tablo 1: Kedi ve köpek sahiplerinin vejetaryen ve vegan olma durumları.

Table 1: Vegetarian and vegan status of cat and dog owners.

	Vejetaryen		Vegan	
	N	%	N	%
Evet	90	8	34	3
Hayır	899	79	1008	89
Olmayı daha önce denedim	58	5	32	3
başaramadım				
Olmayı düşünüyorum	88	8	61	5

Tablo 2: Kedi ve köpek sahiplerinin hayvanların vejetaryen veya vegan beslenmesi hakkındaki görüşleri.

Table 2: Views of cat and dog owners on vegetarian and vegan nutrition of animals.

	Vejetaryen		Vegan	
	N	%	N	%
Uygun	127	11	149	13
Uygun Değil	745	66	726	64
Kararsız	263	23	260	23

Kedi VKS Değerlendirmesi

Çalışmaya dâhil olan kedilerin VKS değerlerine ilişkin bilgi Tablo 3'de verilmiştir.

Cinsiyet faktörüne göre değerlendirme yapıldığında ise dişi kedilerin %35 (159 dişi)'inin, erkek kedilerin ise 206 (%48)'inin aşırı kilolu ve obez olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 3: Kedilerde VKS değerleri.**Table 3:** BCS values in cats.

	N	%
Skor 2	45	5
Skor 3	472	53
Skor 4	281	32
Skor 5	84	10

Tablo 4: Kedilerde normal kilo ile aşırı kilo/obezlik ile cinsiyet ilişkisi.**Table 4:** The relationship between normal weight and overweight/obesity and gender in cats.

	Dişi		Erkek	
	N	%	N	%
Normal kilolu	291	65	226	52
Aşırı kilolu/obez	159	35	206	48

Tablo 5: Köpeklerde VKS değerleri.**Table 5:** BCS values in dogs.

	N	%
Skor 2	32	13
Skor 3	145	57
Skor 4	66	26
Skor 5	10	4

Köpek VKS Değerlendirmesi

Çalışmaya dâhil olan köpeklerin VKS değerlerine ilişkin bilgi Tablo 5'te verilmiştir.

Cinsiyet faktörüne göre değerlendirme yapıldığında ise dişi köpeklerin %39 (42 dişi)'unun, erkek köpeklerin ise %24 (34)'ünün aşırı kilolu ve obez olduğu tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 8: Normal kilolu kedi ve köpeklerin beslenme şekilleri.**Table 8:** Nutritional ways of normal weight cats and dogs.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Ad libitum beslenme	289	42	405	58
Masa artışı verme	236	34	458	66
Ödül maması verme	526	76	168	24
Ek gıdada öğünlerde kısıtlama	293	42	401	58
Dengeli beslediğini düşünme	292	42	402	58

Tablo 9: Aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerin beslenme şekilleri.**Table 9:** Nutritional ways of overweight/obese cats and dogs.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Ad libitum beslenme	251	57	190	43
Masa artışı verme	172	39	269	61
Ödül maması verme	305	69	136	31
Ek gıdada öğünlerde kısıtlama	217	51	217	49
Dengeli beslediğini düşünme	228	52	213	48

Tablo 6: Köpeklerde normal kilo ile aşırı kilo/obezlik ile cinsiyet ilişkisi.**Table 6:** The relationship between normal weight and overweight/obesity and gender in dogs.

	Dişi		Erkek	
	N	%	N	%
Normal kilolu	67	61	110	76
Aşırı kilolu/obez	42	39	34	24

Kısırlaştırmanın Normal Kilolu ve Aşırı Kilolu/Obes Kedi ve Köpekler Üzerindeki Etkisi ile İlgili Veriler

Tablo 7'ye bakıldığında aşırı kilolu/obez (VKS 4-5) olan kedi ve köpeklerin, normal kilolu (VKS 2-3) kedi ve köpeklere göre daha fazla kısırlaştırılma oranlarına sahip oldukları görülecektir.

Tablo 7: Normal kilolu ve aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerin kısırlaştırılma açısından incelenmesi.**Table 7:** Investigation of normal weight and overweight/obese cats and dogs for neutering.

	Normal kilolu		Aşırı kilolu/obez		p
	N	%	N	%	
Kısırlaştırılmış dişi	205	30	165	37	<.001
Kısırlaştırılmış erkek	176	25	179	41	
Kısırlaştırılmayan dişi	159	23	40	9	
Kısırlaştırılmayan erkek	154	22	57	13	

Normal Kilolu ve Aşırı Kilolu/Obes Kedi ve Köpek Sahiplerinin Hayvanlarını Besleme Alışkanlıkları ile İlgili Veriler

Çalışmaya katılan hayvan sahiplerinin hayvanlarını besleme alışkanlıklarını belirlemeye yönelik soruya vermiş oldukları yanıtlar Tablo 8 ve Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 10: Normal kilolu kedi ve köpek sahiplerinin mama seçimi, içerik ve kalitesi ile bağlantılı hususlarla ilgili veriler.**Table 10:** Data on issues related to food selection, content and quality of normal weight cat and dog owners.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Mamanın içeriğini kontrol etme	658	95	36	5
Enerji düzeyini kontrol etme	581	84	113	16
Protein düzeyini kontrol etme	620	89	74	11
GDO içermesi rahatsız eder	575	83	119	17
Markanın önemi	581	84	113	16
Esansiyel aminoasit	280	40	414	60
Veteriner hekim tavsiyesi	609	88	85	12
Sahte mama	568	82	126	18
İlave vitamin- mineral takviyesi	386	56	308	44
İlave supplement kullanımı	184	27	510	73
Düşük enerjili gıdaları bilme durumu	325	47	369	53

Tablo 11: Aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin mama seçimi, içerik ve kalitesi ile bağlantılı hususlarla ilgili veriler.**Table 11:** Data on issues related to food selection, content and quality of overweight/obese cat and dog owners.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Mamanın içeriğini kontrol etme	419	95	22	5
Enerji düzeyini kontrol etme	359	81	82	19
Protein düzeyini kontrol etme	403	91	38	9
GDO içermesi rahatsız eder	364	83	77	17
Markanın önemi	375	85	66	15
Esansiyel aminoasit	153	35	288	65
Veteriner hekim tavsiyesi	380	86	61	14
Sahte mama	359	81	82	19
İlave vitamin- mineral takviyesi	223	51	218	49
İlave supplement kullanımı	122	28	319	72
Düşük enerjili gıdaları bilme durumu	205	46	236	54

Normal Kilolu ve Aşırı Kilolu/Obez Kedi ve Köpek Sahiplerinin Mama Seçimleri, Mama İçerik ve Kalitesi ile Mamanın Fiyatıyla İlgili Veriler

Normal kilolu ve aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin mama seçimi, mama içerik ve kalitesinde dikkat ettikleri hususlarla ilgili veriler Tablo 10 ve Tablo 11'de gösterilmektedir.

Normal kilolu kedi ve köpek sahiplerinin %44 (306)'ü hayvanlarına aldıkları mamaya ödedikleri ücretin önemli olduğunu, %97 (670)'i ayrıca mama fiyatının pahalı olduğunu belirtmişlerdir (Tablo 12). Bu oranlar aşırı kilolu/obez hayvan sahipleri için ise sırasıyla %51 (226) ve %96 (425) şeklinde gerçekleşmiştir (Tablo 13).

Kedi ve Köpek Sahiplerinin Aşırı Kilolu/Obez Hayvanlarının Tedavilerine Yaklaşımlarıyla İlgili Veriler

Kilolu ve obez hayvanlara çeşitli tedavi yaklaşımlarıyla ilgili veriler Tablo 14 ve Tablo 15'te verilmiştir.

Tablo 12: Normal kilolu kedi ve köpek sahiplerinin mama ücretleri hakkındaki düşünceleri ile ilgili veriler.**Table 12:** Data on the opinions of normal weight cat and dog owners about food prices.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Önemlidir	306	44	388	56
Ucuz	32	5	662	95
Pahalı	670	97	24	3

Tablo 13: Aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin mama ücretleri hakkındaki düşünceleri ile ilgili veriler.**Table 13:** Data on the opinions of overweight/obese cat and dog owners about food prices.

	Evet		Hayır	
	N	%	N	%
Önemlidir	226	51	215	49
Ucuz	13	3	428	97
Pahalı	425	96	16	4

Tablo 14: Aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerde cerrahi uygulamalarına kedi ve köpek sahiplerinin yaklaşımları.

Table 14: Approaches of cat and dog owners to surgical applications in overweight/obese cats and dogs.

	Kedi sahipleri		Köpek sahipleri	
	N	%	N	%
Evet	14	1	3	1
Hayır	319	36	94	37
Kararsız	76	9	9	4
Veteriner hekimin gerekli gördüğü durumlar	473	54	147	58

Cerrahi uygulamalar kullanılarak obezite ile tedavi yaklaşımına olumlu bakan hayvan sahiplerinin oranı %1 iken, veteriner hekimlerin öngördüğü durumlarda operatif yaklaşımın kabul edilebilir olduğunu belirten kedi sahiplerinin oranı %54'e, köpek sahiplerinin oranı ise %58'e çıkmaktadır.

Tablo 15. Kedi ve köpeklerde aşırı kilo ve obezite durumunda ilaç ile tedavi yöntemine kedi ve köpek sahiplerinin yaklaşımları.

Table 15. Approaches of cat and dog owners to drug treatment in case of overweight and obesity in cats and dogs.

	Kedi sahipleri		Köpek sahipleri	
	N	%	N	%
Evet	72	8	24	10
Hayır	207	23	64	25
Kararsız	52	6	10	4
Veteriner hekimin gerekli gördüğü durumlar	551	63	155	61

Tedavinin ilaç kullanılarak yapılmasına veteriner hekimin gerekli gördüğü durumlarda olumlu bakanların oranı kedi sahiplerinde %63, köpek sahiplerinde ise %61 olmuştur.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kedi ve köpeklerde obeziteyle ilgili dünya çapında hem klinik hem de anket yoluyla yapılmış çalışmalar bulunmasına ve ülkemizde özellikle anket çalışmaları yoluyla kedi ve köpekleri konu edinen çeşitli anket çalışmaları (Onur 2012; Demir ve Uğurlu Koç 2014; Oğuz 2016; Erten ve ark. 2019; Sarial Kubilay 2019; Tunca 2019; Alarslan ve ark. 2022) yapılmış olmasına rağmen, obezite ve ilişkili durumlar hakkında veriler elde eden çalışma ve/veya çalışmalara rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmayla Türkiye'de obezitenin hayvan sahiplerinin profilleri ile birlikte değerlendirilmesine yönelik kısmen de olsa veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

Hayvan sahiplerinin profilleri kısmında inceleyebileceğimiz bir başka faktör vejetaryen/veganlık konusudur. Günümüzde insanları arasında artmaya başlayan ve bir takım endişeler (yaşam tarzı, inanç, etik değerler ve dünya görüşü) sonucu şekillenen vejetaryen/veganlık ile ilgili sorularla dünyada iyi bilinen ama mazisi Türkiye'de nispeten daha yeni olan konu hakkında bazı rakamsal veriler de elde edilmiştir (Tablo 1 ve 2). Anket çalışmasına katılanların %79'u vejetaryen olmadığını, %8'i olmayı düşündüğünü, %5'i daha önce vejetaryenliği denediğini ama sonradan

bıraktığını, %8'inin ise vejetaryen olduğu tespit edilmiştir. Veganlıkta ise oranlar daha düşük çıkmıştır. Vejetaryenlerin ise %3'ü vegan olduğunu belirtmişlerdir. Hindistan nüfusunun %35, İtalya ve Almanya nüfusunun %9, Amerika nüfusunun %4'ü (%5 şeklinde verilerin olduğu da bildirilmektedir) vejetaryen iken, aynı ülke nüfusunun %2'si vegandır (Tunçay Son ve Bulut 2016). Vejetaryen beslenmeyi uygun bulmayanların oranı %66 (745 kişi) iken, vegan beslenmeyi uygun bulmayanların oranı ise %64 (726) ve her iki beslenme şekli (vejetaryen/vegan) için kararsızların oranı %23 olmuştur. Avusturya, Almanya ve İsviçre'de 233 evcil hayvan sahibiyle yapılan bir araştırmada katılımcıların %90'ı vegan beslenmeye teşvik eden en büyük nedenlerin duygusal olarak inandıkları ahlaki, etik ve hayvan refahı endişeleri olduğunu ortaya koymuştur (Semp 2014).

VKS (5'lik ölçek) değerlendirmesine göre 365 kideden 281 (%32)'i VKS 4 (aşırı kilolu) düzeyinde iken, 84 (%10) kedi VKS 5 (obez) düzeyinde, 76 köpekten 66 (%26)'sının VKS 4 (aşırı kilolu), 10 (%4)'ünün bulunduğu belirlenmiştir (Tablo 3 ve Tablo 5). Aşırı kilo/obezite ile ilgili her iki türe ait veriler de ilgili tablolarda (Tablo 4 ve Tablo 6) gösterilmiştir. Yapılan çeşitli araştırmalar sonucu dünyada obezite görülme sıklığı kedilerde %11.5-%63.0 arasında, köpeklerde ise %11.2 ile %59.4 olarak bildirilmiştir (Verbrugge 2019; Larsen ve Della Maggiore 2020). Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar Türkiye'de kedilerin %42'sinin, köpeklerin ise %30'unun aşırı kilolu ve obez olduklarını ve elde edilen verilerle birlikte Türkiye'deki kedi ve köpeklerin aşırı kilolu ve obez olma oranlarının dünya verilerinin sınırları içerisinde ve bu verilerle uyumlu olduğunu göstermektedir. Brezilya'da köpekler üzerine yapılan bir çalışmada obezite oranı %48 olarak tespit edilmiştir (Porsani ve ark. 2020). Köpekler üzerinde 10 farklı Avrupa ülkesinde yapılan bir araştırma da ise aşırı kilolu ve obez köpeklerin oranı %32 olarak tespit edilmiştir (Munoz-Prieto ve ark. 2018). 2017 yılında 81 ülkeden yanıt alınarak uygulanan kediler üzerine hazırlanmış olan bir anket çalışmasında kedilerin obezite oranları uygulanan iki farklı değerlendirme yönteminin birinde %30.5 diğerinde ise %32.5 olarak bulunmuştur (Wall ve ark. 2019).

Çalışmada normal kedi ve köpekler için %55 olan toplam kısırlaştırma oranının, aşırı kilolu/obez kedi ve köpekler için %78 gibi bir değere ulaştığı tespit edilmiştir (Tablo 7). Cinsiyete göre değerler ayrı ayrı incelendiğinde kısırlaştırma oranının aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerin dişileri için %37, her iki türün erkekleri için ise %41 olduğu görülecektir. Normal kilolu dişi kedi ve köpeklerde kısırlaştırma oranı %30, normal kilolu erkek kedi ve köpeklerde ise %25 olarak tespit edilmiştir. Elde edilen değerlerden de anlaşılacağı üzere aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerin kısırlaştırma yüzdeleri normal kilolu kedi ve köpeklere göre daha fazladır. Normal kilolu kedi ve köpekler ile aşırı kilolu/obez kedi ve köpekler de kısırlaştırma uygulaması istatistiksel olarak da önemli bulunmuştur (p<0.001). Kısırlaştırma ve obezite arasında önemli bir ilişki bulunduğu bilinmektedir (Case ve ark. 2011; Verbrugge 2019). Bilindiği üzere kısırlaştırma sonrasında kedi ve köpeklerin enerji ihtiyaçları azalır ve kilo almaya daha yatkın hale gelirler. Beagle ırkı köpekler ile yapılan bir çalışma da kısırlaştırma operasyonu sonrasında ad libitum beslenme yapılmış ve vücut ağırlığının aşırı arttığı görülmüştür (Jeusette 2004).

Normal ağırlığa sahip kedi ve köpeklerin sahiplerinin %42'si, aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin ise %57'si hayvanlarını ad libitum beslediklerini bildirmişlerdir (Tablo 8 ve Tablo 9). Kedi ve köpeğini

dengeli olarak beslediğini düşünenlerin oranları normal kilolu kedi ve köpek sahiplerinde %42 iken, aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinde ise %52 olarak belirlenmiştir. Kedi ve köpeklerine sofra artığı verenlerin yüzdeleri kilo problemi olmayan kedi ve köpeklerin sahipleri için %34 iken bu oran aşırı kilolu/obez olan kedi ve köpeklerin sahipleri için %39 olmuştur (Tablo 8 ve Tablo 9). Hayvanların önünde sürekli olarak mama kabında yiyeceğin bulunmasının bu farkların ortaya çıkmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

Kedi ve köpekler için mama (diyet) seçiminde ise mamanın türü, nereden alındığı, maddi karşılığının önemli olup olmaması, içeriğine dikkat edilip edilmemesi, beslenme şekli ve takviye besin maddesi kullanımı gibi birçok kriter göz önünde bulundurularak normal kilolu kedi ve köpekler ile aşırı kilolu/obez kedi ve köpeklerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Hayvan sahiplerinin gerek kedi ve köpekleri için mama seçimi yapmalarında gerekse aşırı kilolu/obez hayvanlarının tedavi süreçlerindeki yöntemlerin kullanılmasında veteriner hekime güvenmeleri de öncelikli bir konudur. Mama seçiminde normal kilolu kedi ve köpek sahipleri için veteriner hekime güven duyma oranı %88 iken (Tablo 10), aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahipleri için bu oran %86 şeklinde gerçekleşmiştir (Tablo 11). Normal kilolu kedi ve köpek sahiplerinin %95'i (Tablo 10), aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin ise %95'i (Tablo 11) mamanın içeriğini kontrol ettiklerini belirtmişlerdir.

Normal kilolu ve aşırı/kilolu/obez kedi-köpek hayvan sahiplerinin mama fiyatlarını pahalı bulma oranları hemen hemen aynıdır (%97 ile %96) (Tablo 12 ve Tablo 13), ayrıca normal kiloya sahip kedi ve köpek sahiplerinin %44'ü, aşırı kilolu/obez kedi ve köpek sahiplerinin %51'i mamaya verdikleri paranın önemli olduğunu belirtmişlerdir.

Aşırı kilolu/obez hayvanların tedavisinde ise veteriner hekimlerin gerekli durumlarda cerrahi yöntemlere başvurmasına kedi sahiplerinin %54'ü, köpek sahiplerinin ise %58'i olumlu bakmışlardır (Tablo 14). Kedi ve köpek obezitesi tedavisinde kullanılan ilaçların sayısı ve etkileri sınırlıdır. Obez köpeklerde düşük yağ/yüksek lif oranlı bir diyet ile birlikte obezite tedavisinde kullanılan bir ilacın (mitratapidin etken maddeli) verildiği bir çalışmada (Pena ve ark 2014), düşük yağlı yüksek lifli diyetle ek olarak mitrapid kullanımı, köpek obezitesinin tedavisi sırasında kilo vermeden başka herhangi bir yararlı etki sağlamıyor gibi görüldüğü, diğer taraftan mitratapidin'in, obezite ile ilişkili patolojiler (kan basıncı, lipidler ve hepatik parametreler gibi) üzerinde belirli yararlı etkiler sergiliyor gibi olduğu bildirilmiştir. Mevcut çalışmada hayvan sahiplerine ilaç tedavisinin aşırı kilolu/obez kedi ve köpek tedavisinde kullanılmasını nasıl karşılayacakları sorulmuş, kedi sahiplerinin %63'ü ve köpek sahiplerinin %61'i veteriner hekimin tavsiyelerini önemsediklerini bildirmiştir (Tablo 15). Türkiye'de yapılan ve pet hayvan sahiplerinin sosyo-demografik yapısı ve pet hayvancılığına bakışlarını irdeleyen bir çalışmada pet hayvanları için veteriner hekimlerden bilgi aldıklarını söyleyenlerin oranı Alanya'da %92.5 Mardin'de ise %93.5 düzeyinde gerçekleşmiştir (Erten ve ark. 2019). Dünyada olduğu gibi ülkemizde de konunun uzmanına güvenin ön planda olduğu ortaya çıkmaktadır.

Mevcut araştırma ile Türkiye'de kedi ve köpek obezitesinin görülme sıklığının belirlenmesine yönelik ilk geniş kapsamlı anket çalışması olması açısından önemlidir. Çalışma geniş kapsamlı olduğundan burada elde edilen verilerin ancak bir kısmının değerlendirilmesi

yapılabilmektedir. Araştırmanın sonucunda elde edilen verilerin ışığında dünyanın pek çok ülkesinde olduğu gibi ülkemizde de kedi ve köpeklerin önemli bir oranda aşırı kilolu ve obez oldukları tespit edilmiştir. Bu durumun ortaya çıkmasında hayvan sahiplerinin sosyo-ekonomik durumlarının, yaşam tarzlarının ve hayata bakış açılarının önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. İnsanlarda olduğu gibi kedi ve köpeklerde de hareketsiz bir yaşam tarzının (genellikle küçük alanlarda, apartmanlarda dar bir çevrede yaşama gibi) bu dostlarımızın yaşamlarının konforunu düşürdüğü gerçeği bir kez daha açığa çıkmaktadır. Bu araştırma ile birlikte kedi ve köpek sahiplerinin hayvan bakım ve besleme yönergeleri hakkında bilgi düzeylerinin artırılması yanında veteriner hekimlerin de kendilerine güven duyan hayvan sahiplerinin ihtiyaçlarını karşılayacak düzeyde bilgi ve beceriyle donanımlı olması gerçeği de açığa çıkmaktadır.

Kedi ve köpek sahibi olan ve/veya onlarla ilgilenen her insanın bakım ve beslenme ile ilgili bilgilerini ve bilinçlerini artırmak için mümkün olduğu kadar eğitim faaliyetlerine, seminerlere, konferanslara katılmalarının, internetin imkânlarını kullanarak bilgiye erişmelerinin, dergi, kitap vb. kaynaklardan faydalanmalarının hem insan sağlığı hem de kedi ve köpeklerin sağlıkları açısından önem arz ettiği düşünülmektedir. Sonuç olarak bu araştırmanın sonucunda elde edilen veriler ışığında hayvan sahiplerinin az da olsa kedi ve köpek beslemesi hakkında bilgilerinin olduğu ancak sahip olunan bilginin kedi ve köpeklerin obeziteye yakalanma oranını dünya standartlarının aşağısında olmasına yetmediği, hayvan sahiplerinin daha fazla teorik ve pratik bilgi sahibi olması gerektiği ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla bu çalışmayla ülkemizde açığı bulunan kedi ve köpek obezitesiyle ilgili literatüre kaynak sağlanması, obezite ve bağlantılı konularda ileride yapılması düşünülecek çalışmalara altyapı oluşturulması böylece hem kedi ve köpek obezitesine hem de insan sağlığına yönelik çalışmalara az da olsa katkı sunulması umut edilmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından "TYL-2022-9761" no'lu proje olarak desteklenmiştir. Bu çalışma İzzet Emin DEMİR isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir. Bu çalışma 3. Uluslararası Hayvan Besleme Kongresi, 17-20 Kasım 2022, Antalya isimli kongrede poster sunu olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

Çalışmanın yazarları Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne desteklerinden ötürü teşekkür ederler.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: SA, İED
Denetleme/Danışmanlık: SA
Veri Toplama ve/veya İşleme: İED
Analiz ve/veya Yorum: SA, İED
Makalenin Yazımı: SA
Eleştirel İnceleme: SA

KAYNAKLAR

- Alarслан B, Alarслан E, Söğüt B (2022).** Pet hayvan sahiplerinin pet hayvanlara bakışlarının değerlendirilmesi-Balıkesir ili Bandırma ilçesi örneği. *TTDB*, 9 (3), 651-657.
- Bjornvad CR, Buelund LE (2019).** Evaluation of body composition to diagnose obesity, Cline MC, Murphy M (Ed). Obesity in the dog and cat (pp. 63-82). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Bland IM, Guthrie-Jones A, Taylor R, Hill J (2010).** Dog obesity: Veterinary practices' and owners' opinions on cause and management. *Prevent Vet Med*, 94, 310-315.
- Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch MF (2011).** Canine and Feline Nutrition, A Resource for Companion Animal Professionals. 3th ed. Elsevier Moslay, Missouri.
- Courcier EA, Thomson RM, Mellor DJ, Yam PS (2010).** An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *JSAP*, 51 (7), 362-367.
- Courcier EA, Mellor DJ, Pendlebury E, Evans C, Yam PS (2012).** An investigation into the epidemiology of feline obesity in Great Britain: results of a cross-sectional study of 47 companion animal practises. *Vet Record*, 171 (22), 560-564.
- Demir P, Uğurlu Koç A (2014).** Pet hayvan (kedi-köpek) sahiplerinin veteriner kliniklerine ilişkin beklentileri. *İstanbul Üniv Vet Fak Derg*, 40 (2), 68-75.
- Ergün A, Muğlalı ÖH, Saçaklı P (2013).** Köpek ve Kedi Besleme-Beslenme Hastalıkları ve Klinik Besleme. 1. Baskı. Gezegen Basım, Ankara.
- Erten Ö, Öztürk Y, Yılmaz O (2019).** Türkiye'de pet hayvan sahiplerinin sosyo-demografik yapıları ve pet hayvancılığına bakışları; Alanya-Mardin örneği. *MAE Vet Fak Derg*, 4 (2), 76-83.
- German A (2006).** The growing problem of obesity in dogs and cats. *J Nutr*, 136 (7), 1940-1946.
- Jeusette I, Detilleux J, Cuvelier C (2004).** Ad libitum feeding following ovariectomy in female Beagle dogs: effect on maintenance energy requirement and on blood metabolites. *J Anim Physiol a Anim Nutr*, 88 (3-4), 117-121.
- Kahraman R (2007).** Kedi ve Köpeklerin Beslenmesi ve Beslenme Hastalıkları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu, İstanbul.
- Küçük O (2020).** Pratik Kedi ve Köpek Besleme, Beslenme Hastalıkları. 2. Baskı. Verda Yayıncılık, Kayseri.
- Lafamme DP (2006).** Understanding and managing obesity in dogs and cats. *Vet Clin Small Anim*, 36 (6), 1283-1295.
- Larsen AJ, Della Maggiore A (2020).** Metabolic and Electrolyte Disorders. Weight Loss and Obesity. Nelson RW, Couto CG (Ed). Small Animal Internal Medicine (pp. 898-934). Elsevier, St Louis, Missouri, USA.
- MacDonald PL, Gardner RC (2000).** Type I error rate comparisons of post hoc procedures for I x J chi-square tables. *EPM*, 60, 5.
- Munoz-Prieto A, Nielsen LR, Dabrowski R ve ark. (2018).** European dog owner perceptions of obesity and factors associated with human and canine obesity. *Sci Reports*, 8, 1-10.
- Oğuz K (2016).** Kedi ve Köpeklerin Bakım ve Beslenmesi ile Beslenmeye Bağlı Bazı Problemler ve Davranışlar Arasındaki İlişkiler. Doktora tezi, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hatay, Türkiye.
- Onur E (2012).** İstanbul'da Kedi Köpek Sahiplenmesinin Sosyo-Ekonomik Parametreleri. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- Pena C, Suarez L, Bautista-Castano I ve ark. (2014).** Effects of low-fat high-fibre diet and mitratapide on body weight reduction, blood pressure and metabolic parameters in obese dogs. *J Vet Med Sci*, 76 (9), 1305-1308.
- Porsani M, Oliveira V, Oliveira A ve ark. (2020).** What do brazilian owners know about canine obesity and what risks does this knowledge generate? *Plos One*, 15 (9), 1-14.
- Robertson ID (2003).** The association of exercise, diet and other factor with owner-perceived obesity in privately owned dogs from metropolitan perth, WA. *Prevent Vet Med*, 58, 75-83.
- Russell K, Sabin R, Holt S, Bradley R, Harpet EJ (2000).** Influence of feding regimen on body condition in the cat. *JSAP*, 41 (1), 2-7.
- Saral Kubilay GS (2019).** Pet Hayvanı Sahiplerinin Refahına İlişkin Algı ve Tutumu Üzerine Bir Araştırma. Yüksek Lisans tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon, Türkiye.
- Semp PG (2014).** Vegan nutrition of dogs and cats. Master's Thesis, Institute for Animal Nutrition and Functional Plant Substances, Veterinary University of Vienna, Austria.
- Toll PW, Yamka RM, Schoenherr WD, Hand MS (2010).** Obesity. Hand MS, Thatcher CD, Remillard RL, Roudebush P, Novotny BJ (Ed). Small Animal Clinical Nutrition (pp. 501-542). Mark Morris Institute, Topeka, KS.
- Tunca M (2019).** Klinik Olarak Normal Vücut Kondisyonuna Sahip ve Obez Köpeklerde Rutin Biyo-Belirteçler ve Asimetrik Dimetil Arjinin (ADMA) ve Oksidatif Stres Parametrelerinin Değerlendirilmesi. Doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Türkiye.
- Tunçay Son GY, Bulut M (2016).** Yaşam tarzı olarak vegan ve vejetaryenlik. *Int JHS*, 13 (1), 830-843.
- Verbrugghe A (2019).** Epidemiology of Small Animal Obesity. Cline MC, Murphy M (Ed). Obesity in the Dog and Cat (pp. 1-15). CRC Press, Boca Raton, FL.
- Wall M, Cave NJ, Vallee E (2019).** Owner and cat-related risk factors for feline overweight or obesity. *Front Vet Sci*, 6 (1-13).
- Worthinger A, Burns K (2015).** Weight Management. Nutrition and Disease Management For Veterinary Technicians and Nurses (pp. 179-185). Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Zoran DL (2010).** Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. *Vet Clin Small Anim*, 40, 221-239.



Tablası Alınmış Çerezlik Ayçiçek Hasılına Farklı Katkılarla Silolamanın Silaj Kalitesi, *In-Vitro* Sindirilebilirlikleri ve Enerji İçeriğine Etkisi

Serhat YILDIZ*

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Gevaş Meslek Yüksekokulu, Veterinerlik Bölümü, 65700, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 17.03.2023

Kabul Tarihi: 20.12.2023

ÖZ

Bu çalışma, tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılına (TAÇAH) farklı katkılarla silolanmasının, silaj kalitesi, *in-vitro* sindirilebilirlik ve enerji içeriklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. TAÇAH silajlık materyal olarak parçalanarak, %5 melas ya da %4 arpa kırığı ile karıştırılmış ve bu gruplara 0 ya da 5 g/ton bakteriyel inokulant+enzim karışımı (Bİ+E) ilave edilmiştir. Böylece oluşturulan 6 grup 5'er tekrerrür şeklinde 1 litrelik cam kavanozlara silolanmıştır. 70 günlük inkubasyon süresi sonunda silaj sıvılarının pH değerleri, NH₃-N ve UYA konsantrasyonları belirlenmiştir. Silaj örneklerinde ham besin madde analizleri, *in-vitro* sindirilebilirlikleri ve enerji içerikleri ile silajların Fleig puanları belirlenmiştir. Sonuç olarak silajların analiz değerleri dikkate alındığında, melas, arpa ve Bİ+E karışımlarından kaliteli silajlar elde edilmiş ve kullanılan katkılar silaj kalitesini arttırmıştır. Özellikle, %4 arpa ve 5 g/ton Bİ+E ilavesiyle hazırlanan silaj KM, LA, pH, Fleig puanı, KMS, OMS, SE, ME ve NE_L değerleri açısından, diğer silaj gruplarına nazaran daha iyi sonuç vermiştir. Ayçiçeği hasılına sadece %5 melasın ilave edildiği gruptan da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, bakteriyel inokulant katkısı da silaj kalitesini olumlu yönde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayçiçeği, Enerji, *In-vitro*, Kalite, Sindirim, Silaj.

ABSTRACT

The Effect of Ensiling of Headless Confectionary Sunflower Crop Mixed with Various Additives on Silage Quality, *In-Vitro* Digestibility, and Energy Content

The aim of the study was to investigate silage quality, *in vitro* digestibility, and energy content of headless confectionary sunflower (HCS) ensiled with different additives. HCS was shredded as silage material and mixed with 5% molasses or 4% crushed barley, and these groups were supplemented with 0 or 5 g/ton bacterial inoculant+enzyme mixture (BI+E). Thus, 6 groups were ensiled in 1-liter glass jars in 5 replicates. At the end of the 70-day incubation period, pH values, NH₃-N, and VFA concentrations of silage liquids were measured. Crude nutrient analysis, *in vitro* digestibility, energy content, and Fleig scores of silage specimens were determined. As a result, considering the analysis values of the silages, quality silages were obtained from molasses, barley and BI+E mixtures and the additives used increased the silage quality. Especially, the silage supplemented with 4% barley and 5 g/ton BI+E had better results than the other silage groups regarding DM, LA, pH, Fleig score, DMD, OMD, DE, ME, and NE_L values. Similar results were achieved in the group, where only 5% molasses was added to the sunflower crop. Furthermore, the addition of bacterial inoculant also positively improved the silage quality.

Keywords: Digestion, Energy, *In-vitro*, Quality, Silage, Sunflower.

GİRİŞ

Türkiye'de üretilen tüm kaba yem kaynaklarından sağlanan kaliteli yemler mevcut ihtiyacı karşılayamadığından, hayvanların kaliteli kaba yem ihtiyacı giderek arttığı bildirilmektedir. Gelecekte hayvanlar için gerekli olan yemlerin karşılanmasına yönelik çalışmalar, kaliteli kaba yem açığının hızlı bir üretim programı ile kapatılması ana hedeflerden biri olmalıdır. Bu hedefe ulaşabilmek için üretimini ve kalitesini arttırabileceğimiz yeni yem materyallerinin

geliştirilmesi gerekmektedir (Kara ve ark. 2013).

Çok yönlü faydaları bulunan ve ülkemiz tarımı için önemli yem bitkilerinden biri de ayçiçek (*Helianthus annuus L.*) bitkisidir. Alternatif yem bitkileri içerisinde sayılan ayçiçeği, başta yağ üretimi olmak üzere çerezlik, süs bitkisi, silajlık, hayvan ve kuşyemi olarak da kullanım alanı bulmaktadır (Meral 2019; Tüfekçi 2023). Ayçiçek hasılı dünyanın birçok bölgesinde silaj üretimi amacı ile yetiştirilmektedir. Ancak ülkemizde silaj üretimi amacıyla yetiştirilmesi pek yaygın değildir. Mısır hasılı gibi kolay silolanabilmektedir. Ayçiçeği hasılı tek bitki olarak



silolanabileceği gibi, zor silolan bitkilere de katkı maddesi olabilmektedir (Tepeli 2014; Yıldız 2017; Yıldız ve Erdoğan 2018). Ayçiçeğinden yem olarak yararlanmanın yollarından biri de hasattan sonra kalan bitki sapı ve tohumları alınan tablalarının silaj yapılarak değerlendirilmesidir. Ayçiçek sap ve tablalarından ve diğer bitkilerle karışımlarından iyi kalitede silajlar elde edilebileceği (Konca 2015), yapılan besi çalışmasında ayçiçek atık silajlarının %50 oranında yonca samanının yerine ikame edilebileceği bildirilmektedir (Amini-jabalkandi ve ark. 2007).

Silaj materyallerinin minimum besin kaybı ile muhafaza edilmesi, silaj yapımının temel amaçlarından biridir. Bu amaca ulaşmak için, silaj katkı maddeleri silajların besleyici değerini artırmada ve silolama işlemi sırasındaki bazı riskleri azaltmada yıllar içinde geliştirilerek kullanılmışlardır. Bir silaj katkı maddesi güvenilir, KM kayıplarını azaltan, silajın hijyenik kalitesini ve aerobik stabilitesini iyileştiren, ikincil fermantasyonu sınırlandırabilen, silajın besleyici değerini arttıran, hayvanların performansını arttırabilen, laktik asit bakterilerinin büyümesi uyaran ve üreticilere katkı maddesinin maliyetinden daha fazla getiri sağlayabilecek özelliklere sahip olmalıdır. Silaj fermantasyonunun uyarılması için yaygın olarak tercih edilen melas, laktik asit fermantasyonu için hazır enerji sağlamaktadır. Silajda arzu edilen bir mikrobiyal florayı oluşturmak için bakteriyel inokulantlar da kullanılmaktadır. Bakteriyel inokulantlar silajda oluşan pH ve laktik asit seviyeleri üzerine olumlu etki yapmaktadır (Baytok ve ark. 2005; Meeske 2005). Silaj katkı maddesi olarak enzimler silajlara tek başlarına ya da bakteriyel inokulant karışım halinde kullanılabilir. Enzimler bitki hücre duvarlarını kısmen sindirerek kolay eriyebilir karbonhidratları açığa çıkartarak pH'nın düşürülmesi için LAB (Laktik asit bakterileri) fermantasyonunu uyarmakta ve bitki hücre duvarının kısmi sindirimi nedeniyle sindirilebilirlik oranını iyileştirmektedirler (Kung 2014).

Türkiye'de 2022 yılı istatistiklerine göre, 804 565 dekar (da) alanda çerezlik ayçiçeği ekimi yapılmış ve 200 000 ton çerezlik ayçiçek danesi üretilmiştir (TÜİK 2022). Ayçiçek bitkisinin yüksek verim veren bir bitki olduğu düşünüldüğünde, çok büyük bir yeşil aksam da üretilmektedir. Çerezlik ayçiçeği yetiştiriciliğinde, dane kısmın bulunduğu tabla alınmakta, kalan yaprak ve gövde kısımları ya yakılmakta ya da ortalıkta bırakılarak çevre kirliliği oluşturmaktadır (Kaya 2023).

Yapılan bu çalışmada, tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılının, farklı katkı maddeleriyle karıştırılmasıyla hazırlanan silajların, en uygun silaj yapım şeklinin tespiti ve besin madde içeriklerinin, silaj kalitelerinin, in-vitro sindirilebilirliklerinin ve enerji içeriklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 28/10/2021 tarih ve 2021/10-03 karar numarası ile, yönetmeliğinin ilgili maddesi uyarınca "Çalışma ve Araştırma Kesin Sonuç Onay Belgeleri" alınmasına gerek bulunmadığına karar verilmiştir.

Materyal

Çalışmada kullanılan tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı Van ili Gevaş ilçesinde bir yetiştiriciden, bakteriyel inokulant-enzim karışımı (Sil-All 4x4, Lallemand Animal

Nutrition UK Ltd), arpa kırması ve melas piyasadan temin edilmiştir.

Metot

Tablası alınmış çerezlik ayçiçek hasılı, tablalar alındıktan sonra biçilip silaj materyali şeklinde parçalanmış ve ağırlık esasına göre arpa kırığı (A), melas (M) ve B1+E karışımıyla Tablo 1'de verildiği şekilde toplam 30 adet silaj örneği, 1 litrelik cam kavanozlara sıkıştırılarak doldurulmuştur. Cam kavanozların kapakları delinip ters çevrilmiş ve 48 saat boyunca silo suyu drenajı sağlanmıştır (Karadağoğlu ve Özduven 2019; Yıldız ve ark. 2022a; Yıldız ve ark. 2022b). Süre sonunda delinen kavanoz kapakları, hava almaması için koli bandıyla tekrar kapatılmıştır. Kavanozlar 70 günlük inkubasyon süresi sonrasında açılmıştır.

Tablo 1: Denemede çalışma düzeni.

Table 1: Trial layout of the study.

Silaj Grupları	Tekerrür
1. Grup: Kontrol (Katkısız-tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı)	5
2. Grup-Kontrol + %5 Melas	5
3. Grup-Kontrol + %4 Arpa kırığı	5
4. Grup-Kontrol + 5 g/ton bakteriyel inokulant+enzim	5
5. Grup-Kontrol + %5 Melas+ 5 g/ton bakteriyel inokulant+enzim	5
6. Grup-Kontrol + %4 Arpa kırığı+ 5 g/ton bakteriyel inokulant+enzim	5

Silajların hazırlanmasında kullanılan bakteri inokulant-enzim karışımlarına ait içerikler Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Silaj yapımında kullanılan bakteriyel inokulant+enzim karışımının bileşimi.

Table 2: Components of bacterial inokulant-enzyme mixture used in silages.

İçerik	Miktar
Lactobacillus plantarum	1.00x10 ¹⁴ CFU/kg
Pediococcus acidilactici	4.00x10 ¹³ CFU/kg
Pediococcus pentosaceus	4.00x10 ¹³ CFU/kg
Propionibacterium acidipropionici	2.00x10 ¹³ CFU/kg
Alpha-amylase, Bacillus amyloliquefaciens	3600000 BAU/kg
Cellulase, Trichoderma longibrachiatum	60000 CMCU/kg
Beta-glucanase, Aspergillus niger	1000000 IU/kg
Xylanase, Trichoderma longibrachiatum	1500000 IU/kg
Organik şeker, Kolloidal silica	566.3 g/kg

Silajlar açıldıktan hemen sonra silaj sıvılarının pH değerleri dijital pH metre ile belirlenmiştir (Polan ve ark. 1968). Tüm örnekler 65 °C'de 48 saat kurutulup, laboratuvar tipi değirmende 1mm ebatlarında öğütülmüştür. Silaj materyallerinin kuru madde (KM), ham protein (HP) ve ham kül (HK) analizleri Weende analiz yöntemine göre (AOAC 1990), ham yağ (HY) analizleri Ankom ham yağ cihazı ile belirlenmiş (Ankom 2023), ADF

ve NDF analizleri için Goering ve Van Soest, (1970) tarafından bildirilen yöntemler kullanılmıştır. Silaj sıvılarının Amonyak azotu (NH₃-N) konsantrasyonlarının tespitinde distilasyon yönteminden yararlanılmıştır (Markham 1942). Silaj sıvılarına ait asetik (AA), propiyonik (PA), bütirik (BA) ve laktik asit (LA) miktarları, Agilent Hi-Plex organik asit kolonu ile HPLC cihazında tespit edilmiştir (Suzuki ve Lund 1980). Silajlara ait Fleig puanları Kılıç (1986)'ın bildirdiği aşağıda verilen eşitlik ile tespit edilmiştir.

$$\text{Fleig Puanı} = 220 + (2\% \text{KM} - 15) - 40 \times \text{pH}$$

Silaj örneklerine ait in-vitro KM ve OM sindirilebilirliklerinin belirlenmesi Ankom Daisy II Incubator (Ankom Technology 2052 O'Neil Road, Macedon NY 14502) cihazı kullanılmış ve aşağıdaki formül kullanılmıştır (Ankom 2002).

$$\text{In-vitro sindirilebilirlik, \% (IVS)} = 100 - \left(\frac{W3 - (W1 \times C1)}{W2} \times 100 \right)$$

W1: Kese ağırlığı, W2: Örnek miktarı, W3: NDF analiz sonu ağırlığı, C1: Boş kese düzeltme katsayısı.

Silajlara ait enerji düzeyleri NRC (2001) ve Ishler ve ark. (2000)'nın bildirdiği eşitlikle belirlenmiştir.

SE, Sindirilebilir Enerji, Mcal/kg KM, (Ishler ve ark. 2000)

$$\text{SE} = \% \text{TSM}(\text{OMS}) \times 0,04409$$

TSM: Toplam Sindirilebilir Besin Maddeleri (Organik Madde Sindirilebilirliği)

ME, Metabolik Enerji, kcal/kg KM, (Ishler ve ark. 2000)

$$\text{ME} = \text{SE} \times 0,082$$

NE_L, Net Enerji Laktasyon, Mcal/kg KM, (NRC 2001)

$$\text{NE}_L = (\% \text{TSM}(\text{OMS}) \times 0,0245) - 0,12$$

İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS (Ver. 13) paket programı kullanıldı. Tüm parametreler ortalama \pm standart sapma olarak ifade edildi. Grupların istatistiksel analizleri, gruplar arasındaki karşılaştırmalı analiz için One-way ANOVA ve ardından Post-Hoc çoklu karşılaştırmalar (Tukey testi) kullanıldı. $p \leq 0.05$ olan veriler anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Bu çalışma, tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılına, farklı katkıların değişik oranlarıyla karıştırılmasıyla hazırlanan silajların besin madde içeriklerinin, silaj kalitelerinin, in-vitro sindirilebilirliklerinin ve enerji içeriklerinin tespit edilmesi amacıyla yapılmıştır. Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılına silolama öncesi besin madde içerikleri Tablo 3'te verilmiştir.

Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılına silolama öncesi tespit edilen besin madde içerikleri incelendiğinde, en yüksek KM, HY, NDF ve ADF değerleri 6. grupta; en yüksek HK değeri 3. grupta; en yüksek HP değeri ise, 5. grupta belirlenmiştir.

Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarında tespit edilen besin madde içerikleri Tablo 4'te verilmiştir. Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarının besin madde içerikleri incelendiğinde, tüm silaj gruplarında, besin madde içerikleri için gruplar arasındaki farklılık önemli ($p < 0.05$) bulunmuştur. Çalışmada KM ve HY değerleri en yüksek 6. grupta, HK, NDF ve ADF değerleri en yüksek 1. grupta (kontrol), HP değeri ise, en yüksek 2. grupta tespit edilmiştir.

Tablo 3: Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı ve farklı katkı karışımlarının silolama öncesi besin madde içerikleri (% KM).

Table 3: Pre-ensiling nutrient contents (DM, %) of headless confectionary sunflower with various additive mixtures.

Gruplar	KM, %	OM, %	HK, %	HP, %	HY, %	NDF, %	ADF, %
1. Grup	22.75	85.90	14.10	7.83	2.87	47.04	35.70
2. Grup	25.54	87.97	12.03	8.22	2.83	48.97	36.30
3. Grup	24.54	84.54	15.46	8.41	2.84	45.68	34.01
4. Grup	21.76	88.92	11.08	8.04	3.67	45.65	31.27
5. Grup	23.22	85.32	14.68	9.96	2.97	42.70	31.67
6. Grup	25.57	86.03	13.97	7.80	3.67	49.22	37.49

KM: kuru madde OM: organik madde, HK: ham yağ, HP: ham protein, HY: ham yağ, NDF: nötral deterjan fiber, ADF: asit deterjan fiber.

Tablo 4: Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı ile farklı katkı maddeleriyle hazırlanan silajlarının besin madde içerikleri (% KM).

Table 4: Nutrient contents (DM %) of silages prepared with headless confectionary sunflowers and different additives.

Gruplar	N	KM, %	OM, %	HK, %	HP, %	HY, %	NDF, %	ADF, %
1. Grup	5	23.89 \pm 0.30 ^d	86.77 \pm 0.20 ^c	13.23 \pm 0.20 ^a	7.62 \pm 0.19 ^{bc}	4.45 \pm 0.33 ^b	50.77 \pm 1.03 ^a	37.16 \pm 0.71 ^a
2. Grup	5	28.23 \pm 0.22 ^{ab}	88.26 \pm 0.18 ^b	11.73 \pm 0.18 ^b	9.43 \pm 0.18 ^a	4.66 \pm 0.28 ^b	42.22 \pm 0.64 ^c	30.31 \pm 0.46 ^c
3. Grup	5	25.69 \pm 0.21 ^c	88.49 \pm 0.25 ^b	11.51 \pm 0.25 ^b	8.45 \pm 0.39 ^b	3.33 \pm 0.42 ^c	49.16 \pm 0.53 ^{ab}	34.36 \pm 0.66 ^b
4. Grup	5	25.80 \pm 0.31 ^c	88.78 \pm 0.09 ^b	11.22 \pm 0.09 ^b	7.09 \pm 0.17 ^c	4.36 \pm 0.22 ^b	46.68 \pm 1.05 ^b	34.08 \pm 0.70 ^b
5. Grup	5	27.97 \pm 0.42 ^b	89.81 \pm 0.17 ^a	10.19 \pm 0.17 ^c	8.20 \pm 0.24 ^b	4.10 \pm 0.13 ^{bc}	42.30 \pm 1.28 ^c	29.91 \pm 1.08 ^c
6. Grup	5	28.99 \pm 0.20 ^a	88.68 \pm 0.07 ^b	11.32 \pm 0.07 ^b	8.32 \pm 0.35 ^b	5.64 \pm 0.16 ^a	39.30 \pm 0.54 ^d	28.87 \pm 0.28 ^c
p-değeri		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p < 0.05$). KM: kuru madde OM: organik madde, HK: ham yağ, HP: ham protein, HY: ham yağ, NDF: nötral deterjan fiber, ADF: asit deterjan fiber.

Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarının fermentasyon kalitesi ve Fleig puanları Tablo 5'te verilmiştir. Silajların fermentasyon değerleri, silajların kalitelerinin belirlenmesinde önemli kriterlerden birisidir. Bu çalışmada, tüm silaj gruplarında, fermentasyon parametreleri için gruplar arasındaki farklılık önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Çalışmada LA ve Fleig puanı en yüksek 6. grupta; pH değerleri ise en düşük 6., 4. ve 5. gruplarda tespit edilmiştir. Silaj kalitesini olumsuz etkileyen parametreler, 1. ve 3. gruplarda elde edilmiştir.

Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarının in-vitro KMS ve OMS ile enerji içerikleri Tablo 6'da verildiği şekildedir. Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarının in vitro KMS ve OMS ile enerji içeriklerine bakıldığında, tüm silaj gruplarında, tüm sindirilebilirlikler ile enerji içerikleri için gruplar arasındaki farklılık önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Çalışmada KMS, OMS, SE, ME ve NEL içerikleri en yüksek 2. ve 6. Gruplarda, buna karşılık en düşük değerler ise 1. grupta tespit edilmiştir.

Tablo 5: Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılının farklı katkılarla hazırlanan silajların fermentasyon kalitesi ve Fleig puanları.

Table 5: Fermentation quality and Fleig scores of silages prepared with different additives and headless confectionary sunflowers.

Gruplar	N	pH	LA, %	AA, %	PA, %	BA, %	NH ₃ -N mg/dl	Fleig puanı	Nitelik sınıfı
1. Grup	5	5.66±0.05 ^a	0.16±0.08 ^c	0.78±0.19 ^a	0.49±0.57 ^a	12.48±0.92	93.21±5.44 ^a	26.38±1.6 ^d	Orta
2. Grup	5	4.52±0.02 ^b	1.92±0.09 ^b	0.43±0.36 ^b	0.17±0.06 ^b	-	70.52±1.63 ^b	80.74±1.12 ^c	İyi
3. Grup	5	5.65±0.10 ^a	0.09±0.35 ^c	0.47±0.61 ^b	0.35±0.32 ^a	10.92±0.40	85.86±1.85 ^a	30.22±4.3 ^d	Orta
4. Grup	5	4.28±0.03 ^c	2.45±0.08 ^a	0.27±0.17 ^b	0.12±0.28 ^b	-	49.58±2.51 ^d	85.40±1.07 ^{bc}	Pekiyi
5. Grup	5	4.32±0.05 ^c	2.02±0.03 ^b	0.17±0.05 ^b	0.15±0.06 ^b	0.72±0.19	58.83±2.09 ^{bc}	88.13±2.34 ^{ab}	Pekiyi
6. Grup	5	4.25±0.01 ^c	2.48±0.22 ^a	0.32±0.11 ^b	0.13±0.04 ^b	-	66.56±0.45 ^b	92.99±0.64 ^a	Pekiyi
p-değeri		0.000	0.000	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^{a,b,c,d}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$). pH: asitlik derecesi, LA: laktik asit, AA: asetik asit, PA: propiyonik asit, BA: bütirik asit, NH₃-N: amonyak azotu.

Tablo 6: Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı ile farklı katkı maddeleriyle hazırlanan silajlarının *in vitro* KM ve OM sindirilebilirlikleri (%) ve enerji içerikleri.

Table 6: *In vitro* DM and OM digestibility (%) and energy content of silages prepared with headless confectionary sunflowers and different additives.

Gruplar	N	KMS, %	OMS, %	SE, Mcal/ kg KM	ME, kcal/kg KM	NE _L , Mcal/kg KM
1. Grup	5	60.90±1.29 ^c	48.75±0.65 ^e	1.05±0.01 ^d	0.86±0.01 ^d	0.47±0.01 ^d
2. Grup	5	71.99±0.90 ^a	58.06±0.66 ^b	1.24±0.01 ^{ab}	1.02±0.01 ^{ab}	0.57±0.01 ^{ab}
3. Grup	5	64.21±0.69 ^b	51.25±0.30 ^d	1.13±0.01 ^c	0.93±0.01 ^c	0.51±0.01 ^c
4. Grup	5	65.82±0.72 ^b	53.50±1.22 ^c	1.14±0.01 ^c	0.93±0.01 ^c	0.51±0.01 ^c
5. Grup	5	66.20±1.01 ^b	59.55±0.84 ^b	1.23±0.02 ^b	1.01±0.02 ^b	0.56±0.01 ^b
6. Grup	5	70.80±0.96 ^a	62.14±0.50 ^a	1.28±0.02 ^a	1.05±0.01 ^a	0.59±0.01 ^a
p-değeri		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

^{a,b,c,d,e}: Aynı sütunda farklı harfleri taşıyan ortalamalar arasındaki farklılıklar önemlidir ($p<0.05$). KMS: kuru madde sindirilebilirliği, OMS: organik madde sindirilebilirliği, SE: sindirilebilir enerji, ME: metabolik enerji, NE_L: net enerji laktasyon.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Sürdürülebilir bir hayvancılık için çözüme kavuşturulması gerekli önemli sorunların başında, kaliteli ve ucuz kaba yem ihtiyacının karşılanması gelmektedir. Hem ucuz hem de insan tüketiminde kullanılmayan alternatif kaba yemlerin ruminant beslemede kullanılması oldukça önemlidir. Bu açıdan bakıldığında, taşıdığı üstün özelliklerinden dolayı, ayçiçek bitkisi ön plana çıkmaktadır. Bu çalışma, değişik katkılarla hazırlanan tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarının besin madde içeriklerinin, silaj kalitelerinin, in-vitro sindirilebilirliklerinin ve enerji içeriklerine ait parametrelerin tespit edilmesi için yapılmıştır. Araştırmada, karışımların silolama öncesi besin madde içerikleri Tablo 3'te verilmiştir. Silolama öncesi tespit edilen besin madde içerikleri incelendiğinde, arpa ve

melas katkısının, karışımların KM düzeyini kontrol grubuna kıyasla yükselttiği belirlenmiştir.

Tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarında tespit edilen besin madde içerikleri Tablo 4'te verilmiştir. Silajların besin madde içerikleri incelendiğinde, silaj gruplarında, incelenen bütün besin madde içerikleri için gruplar arasındaki farklılıklar önemli ($p<0.05$) bulunmuştur. Çalışmada arpa ya da melas katkısının, silajların KM ve HP düzeyini arttırdığı belirlenmiştir. Özellikle melas içeren grupların NDF ve ADF düzeylerinin düştüğü gözlenmiştir. Benzer etki, arpa ve inokulant+enzim karışımı içeren grupta da tespit edilmiştir. Ayçiçeği kalıntılarında peynir altı suyu tozu ve üre ilavesiyle yapılan silajların, Mohabadi süt keçilerinde potansiyel yem kaynağı olabilirliği üzerine yapılan bir çalışmada (Gholami-Yangije ve ark. 2019), katkılı ayçiçek kalıntı silajlarında, katkısız silajlara göre HP değerlerinin yükseldiği, NDF ve ADF değerlerinin ise düştüğü tespit edilmiştir. Bu değerlerin, yapılan bu çalışma ile benzerlik

gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, ayçiçeği kalıntı silajlarının Mohabadi süt keçerlerinde kabul edilebilir bir yem kaynağı olabileceğini bildirmişlerdir. Erdoğan ve Demirel (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, farklı vejetasyon dönemlerinde biçilen ayçiçek hasıllarına farklı oranlarda fibrolitik enzim ilavesiyle hazırlanan silajlarda, katkıların silaj KM değerini yükselttiği ve genel olarak değerlendirildiğinde, enzim takviyesinin ayçiçeği silajının besleyici değeri ve silaj özellikleri üzerinde derin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Denek ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada, üre+buğday kırmama katkısının silajların NDF ve ADF değerlerini düşürdüğü bildirilmiştir. Yine ayçiçeği hasılının farklı katkı maddeleriyle silolanmasıyla elde edilen silajların kalitesinin incelendiği bir çalışmada (Laloğlu 2015), ayçiçek silajlarına yapılan katkılar, silajların HP değerlerini arttırmış; melaslı gruplar ise, enzim ve LAB içeren gruplara kıyasla NDF değerlerini düşürmüştür, ancak ADF değerlerini etkilememiştir.

Bu çalışmada, silajların pH değerleri 5.66-4.25 aralığında tespit edilmiştir. 4. ve 6. gruplarda elde edilen değerler, optimum silaj pH değerleri olan 3.8-4.2 değerine yakın ve pH değeri açısından gruplar arasındaki farklılığın önemli olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmada incelenen parametreler açısından (pH, LA, BA) kontrol grubunda, silaj kalitesinin oldukça düşük olduğu; ancak bu silaja %5 melas katkısının yalnız başına bile, silaj fermentasyon özelliklerini iyileştirdiği belirlenmiştir. Ancak benzer etki, kontrol silajına %4 arpa katkısı yapılan 3. gruptan elde edilememiştir. Çalışmada, silajlara inokulant+enzim katkısı, 4, 5 ve 6. gruplarda silaj fermentasyon kalitesini yükseltmiştir. Nitekim, grupların Fleig puanları incelendiğinde, inokulant+enzim katkısının silaj kalitelerini yükselttiği ve bu silajların "pekiyi" kalitede olduğu belirlenmiştir. $\text{NH}_3\text{-N}$ parametresi açısından da sadece melas ya da inokulant+enzim katkılı gruplarda da benzer olumlu etki gözlenmiştir. Özduven ve ark. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada, laktik asit bakterisi inokulantları ayçiçeği silajının fermentasyon ve aerobik stabilitesi üzerine etkileri incelenmiş, kullanılan LA bakterisi inokulantları kontrol grubuna göre silajların pH ve $\text{NH}_3\text{-N}$ değerlerini düşürdüğü ve homofermantatif laktik asit bakterisi inokulantının ayçiçeği silajlarının fermentasyon özelliklerini iyileştirdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, yapılan bu çalışma ile uyum göstermektedir. Benzer bir çalışmada, ayçiçek silajlarının fermentasyon ve aerobik stabilitesi belirlenmiş, silaj pH'sı 3.84, LA ve AA değerleri ise %1.51 ve %1.76 şeklinde belirlemişlerdir (Koç ve ark. 2009). Bu değerler, pH ve LA açısından, bu çalışmada elde edilen değerlerden düşük, AA değeri bakımından yüksek olduğu görülmektedir. Bu araştırmacılar ayçiçeği hasılına bakteriyel inokulant ilavesi ile silajlarda fermentasyon kalite kriterlerinin iyileştirildiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, farklı vejetasyon dönemlerinde hasat edilen ayçiçeği hasılı silajlarına ait besin içerikleri ve fermentasyon parametreleri ele alınmıştır. Silajların fermentasyon özellikleri incelenmiş ve silaj pH değerinin bu çalışmada elde edilen değerlere benzer, LA, AA ve PA değerinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, hasat döneminin geciktirilmesiyle ve enzim ilavesiyle silaj pH'sının yükseldiği, AA, PA ve BA değerlerinin düştüğü bildirilmiştir (Erdoğan ve Demirel 2016). Özduven ve ark. (2009) ayçiçeği silajında pH'nın 3.96 ile 4.22 arasında, LA konsantrasyonunun KM'de %5.96 ile 7.94 arasında değiştiğini ve LA Bİ+E katkısıyla artış gösterdiğini, $\text{NH}_3\text{-N}$ düzeyinin ise, yine bu katkının etkisiyle (65.46 g/kg TN) düştüğünü tespit etmişlerdir. Benzer şekilde, yapılan bu çalışmada da katkılar fermentasyon kalitesini

iyileştirmiştir. Yapılan bir çalışmada, ayçiçeği hasılının silolanması sırasında kullanılan homofermantatif LA bakterisi inokulantları, silajlarda laktik asit üretimine katkıda bulunmuşlardır. Sonuçta silajların pH'sı, asetik asit ve $\text{NH}_3\text{-N}$ değerleri önemli bir şekilde düşmüş, böylece silaj kaliteleri iyileştirilmiştir. Diğer yandan heterofermantatif LA bakterisi inokulantları silajların amonyak azotu, asetik asit içeriklerini artırırken, laktik asit/asetik asit oranını azaltmıştır (Tepeli 2014).

Bu çalışmada, ayçiçek silajlarının Fleig puanı nitelik sınıfı 4., 5. ve 6. gruplarda "pekiyi"; 2. grup ayçiçek silajında "iyi" ve kontrol ve 3. grupta "orta" olarak belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen Fleig puanları incelendiğinde 4., 5. ve 6. gruplarda Bİ+E katkısı silaj fermentasyonunu iyileştirmiş ve nitelik sınıfları pekiyi olmuştur. Aşayan ve Karakozak (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, ayçiçeği, bürülce, sorgum ve soya bitkileri inokulantlı ve inokulantlı olarak silajları yapılmıştır. Silaj materyallerine inokulant katkısı olumlu sonuç vermiş, inokulantlı silajlarda ayçiçeği ile bürülce silajının yem niteliği bakımından en iyi silaj çeşidi olmuştur. Ancak inokulantlı silajlarda bürülce silajının yem niteliği bakımından pekiyi değeri aldığı belirlenmiştir. Yapılan başka bir çalışmada (Karakozak ve Aşayan 2010) fiğ, arpa ve yulaf silajları ve bunların farklı oranlarda karışımlarından elde edilen silajların kalitesi üzerine inokulant katkısının etkisi araştırılmış ve kışık silajlarda saf fiğ, yazlık silajlarda ise %30 mısır + %70 soya silajı en yüksek Fleig puanı almış; inokulant katkılarının silaj kalitesini arttırmış, yapılan bu çalışma sonuçlarıyla benzer şekilde olduğu tespit edilmiştir. Yıldız ve ark. (2022b) tarafından yapılan bir çalışmada ayçiçek hasılına şeker pancarı katkısının Fleig puanlarını arttırdığı; aynı araştırmacıların yapmış olduğu başka bir çalışmada (Yıldız ve ark. 2022a), lenoks hasıllarına yapılan melas ve arpa katkılarının silajların Fleig puanlarını arttırdığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı silajlarına ait in-vitro KMS ve OMS ile enerji parametreleri incelenmiş, KMS, OMS, SE, ME ve NEL değerleri için gruplar arasındaki farkın önemli ($p<0.05$) olduğu belirlenmiş ve tüm parametrelerde en yüksek değerler 6. grup olan arpa kırmama ve Bİ+E katkılı silajdan elde edilmiştir. Ancak, sadece melas katkılı 2. gruba ait değerler de 6. gruba benzer bulunmuştur. Kontrol grubuna göre tüm silajlarda katkı maddeleri silaj kalitesini arttırmış, bu da silajların sindirilebilirliğini iyileştirmiştir (Tablo 6). Ayçiçek hasılına melas, LAB ve enzim ilavesi ile silajların kalitesi üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada (Konca ve ark. 2015), silajların KMS için melaslı gruptan, OMS için LAB'lı gruptan daha iyi sonuç alındığı; ME için LAB katkılı gruptan daha iyi sonuç alındığı tespit edilmiştir. Denek ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada mısır, sorgum ve ayçiçeği hasıllarına farklı oranlarda yapılan katkılarda, kontrol grubuna göre silajlara üre ve üre+buğday katkılarının *in vitro* sindirilebilirliği düşürdüğü, üre+melas katkısının ise arttırdığı belirlenmiştir. Bu çalışmadaki melas katkısının *in vitro* sindirilebilirliği yükseltmesi, yapılan bu çalışma ile benzer bulunmuştur.

Sonuç olarak tablası alınmış çerezlik ayçiçeği hasılı ile melas, arpa ve Bİ+E katkılarıyla hazırlanmış olan silajların, ham besin madde, silaj fermentasyon özellikleri, in-vitro KM ve OM sindirilebilirliği ile enerji değerleri dikkate alındığında, melas, arpa ve Bİ+E karışımlarından kaliteli silajlar elde edilmiş ve bu katkılar silaj kalitesini arttırmıştır. Özellikle, %4 arpa ve 5 g/ton bakteriyel inokulant+enzim ilavesiyle hazırlanan silaj KM, LA, pH,

Fleig puanı, KMS, OMS, SE, ME ve NEL değerleri açısından, diğer silaj gruplarına nazaran daha iyi sonuç vermiştir. Ayçiçeği hasılına sadece %5 melaşın ilave edildiği gruptan da benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca, bakteriyel inokulant ilavesi de silaj kalitesine olumlu katkı sağlamıştır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: SY
Denetleme/Danışmanlık: SY
Veri Toplama ve/veya İşleme: SY
Analiz ve/veya Yorum: SY
Makalenin Yazımı: SY
Eleştirel İnceleme: SY

KAYNAKLAR

- Amini-jabalkandi J, Pirmohammadi R, Razzagzadeh S (2007).** Effects of different levels of sunflower residue silage replacement with alfalfa hay on Azari male buffalo calves fattening performance. *Ital J Anim Sci*, 6 (2), 495-498.
- Ankom (2002).** Operator's Manual ANKOM II 200/220 Fiber Analyzer. ANKOM Technology Corp, 2052 O'Neil Rd, Macedon NY 14502 Erişim tarihi: 28.10.2023 Erişim adresi: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/A200_Manual.pdf.
- Ankom (2023).** ANKOM Technology Method Analytical Procedure XT10/XT10i/XT15/XT15i Erişim tarihi: 13.12.2023 Erişim adresi: https://www.ankom.com/sites/default/files/document-files/XT15_Manual.pdf.
- AOAC (1990).** Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Vol.1. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Ayaşan T, Karakozak M (2012).** İnokulant kullanımının değişik yem bitkilerinden oluşan silajlarda ham besin maddeleri ile kalite üzerine etkisi. *F U Vet J Health Sci*, 26 (2), 93-98.
- Baytok E, Aksu T, Karşlı MA, Muruz H (2005).** The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turk J Vet Anim Sci*, 29 (2), 469-474.
- Denek N, Can A, Tüfenk Ş (2004).** Mısır, sorgum ve ayçiçeği hasıllarına değişik katkı maddeleri katılmasının silaj kalitesi ve *in vitro* kuru madde sindirimine etkisi. *J Agric Fac HR U*, 8 (2), 1-10.
- Erdoğan S, Demirel M (2016).** Conservation characteristics and nutritive value of sunflower silages as affected by the maturity stages and fibrolytic enzymes. *Turkish JAF Sci Tech*, 4 (6), 464-469.
- Gholami-Yangije A, Pirmohammadi R, Khalilvandi-Behroozyar H (2019).** The potential of sunflower (*Helianthus annuus*) residues silage as a forage source in Mohabadi dairy goats. *Veterinary Research Forum*, 10 (1), 59-65.
- Goering MK, Van Soest PJ (1970).** Forage fibre analysis. Agricultural Handbook, No.379. *Agric. Res.*, U.S. Dep. Agric.
- Ishler V, Heinrichs J, Varga G (2000).** From feed to milk: Understanding rumen function. Penn State Uni. College of Agricultural Sci. Extension Circular 422. USA.
- Kara B, Yıldız F, Özkul J (2013).** Sebze olarak tüketilen bazı bitki hasat artıklarının silaj olarak değerlendirilme olanakları. *SDÜ Fen Bil Enst Der*, 17 (1), 76-80.
- Karadağoğlu, Ö, Özdüven ML (2019).** Effects of fermentation characteristics and feed value of some triticale cultivars ensiled at different stages of maturity. *J of Turkish Vet Med Soc*, 90 (2), 132-142.
- Karakozak M, Aşayan T (2010).** Effect of inoculant in silages in which different forage crops and their mixtures on Fleig point and crude nutrient content. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 16 (6), 987-994.
- Kaya Y (2023).** Türkiye'deki çerezlik ayçiçeği ve tohumculuğu. Erişim tarihi: 28.02.2023 Erişim adresi: <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/ttae/Sayfalar/Detay.aspx?Sayfalid=52>.
- Kılıç A (1986).** Silo Yemi. (Öğretim, Öğrenim ve Uygulama Önerileri), Ege Univ. Ziraat Fak.Zootekni Bölümü, Bilgehan Basımevi, Bornova-İzmir, 327.
- Koç F, Özdüven ML, Coşkuntuna L, Polat C (2009).** The effects of inoculant lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of sunflower silage. *Poljoprivreda*, 15 (2), 47-52.
- Konca (2015).** Kaba yem üretiminde yeni alternatifler: Çerezlik kabak ve ayçiçeği artıklarından silaj yaparak yararlanma olanakları. Erişim tarihi: 28.02.2023 Erişim adresi: https://www.researchgate.net/publication/284341100_Kaba_Yem_Uretiminde_Yeni_Alternatifler_Cerezlik_Kabak_Ve_Aycicegi_Artiklarindan_Silaj_Yaparak_Yararlanma_Olanaklari.
- Konca Y, Beyzi SB, Kaliber M, Ülger İ (2015).** Chemical and nutritional changes in sunflower silage associated with molasses, lactic acid bacteria and enzyme supplementation. *Harran J Agri and Food Sci*, 19 (4), 223-231.
- Kung Jr L (2014).** A review on silage additives and enzymes. Department of Animal and Food Sciences University of Delaware Newark, DE 19717-1303. Erişim tarihi: 28.02.2023 Erişim adresi: <https://cpb-us-e1.wpmucdn.com/blogs.cornell.edu/dist/e/4211/files/2014/04/A-Review-of-Silage-Additives-1dj7idb.pdf>.
- Laloğlu M (2015).** Determination of Quality Features of Sunflower Silage Ensiled Different Additives. Erciyes University, Institute of Health Sciences, Department of Animal Nutrition and Nutritional Diseases, Master Thesis, May 2015, Kayseri.
- Markham P (1942).** A steam distillation apparatus suitable for micro-kjeldahl analyses. *Journal Biochemistry*, 36, 790-797.
- Meeser R (2005).** Silage additives: Do they make a difference? *SA-ANIM SCI*, vol 6: Erişim tarihi: 28.02.2023 Erişim adresi: <http://www.sasas.co.za/Popular/Popular.html> 49.
- Meral UB (2019).** An overview of importance and production of sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Int J Life Sci Biotechnol*, 2 (2), 58-71.
- NRC (National Research Council) (2001).** Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th revised edn. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C., U.S.A.
- Ozduven ML, Koc F, Polat C, Coskuntuna L (2009).** The effects of lactic acid bacteria and enzyme mixture inoculants on fermentation and nutrient digestibility of sunflower silage. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (2), 195-199.
- Özdüven ML, Tepeli C, Okuyucu B (2017).** The Effects of Lactic Acid Bacterial Inoculants on the Fermentation and Aerobic Stability of Sunflower Silages. *J Tekirdag Agric Fac*, 14 (02), 9-15.
- Polan CE, Starling TM, Huber JT, Miller CN, Sandy RA (1968).** Yields, composition and nutritive evaluation of barley silage at three stages of maturity for lactating cows. *J Dairy Sci*, 51, 1801-1805.
- SPSS IBM SPSS statistics version 13.0 for Windows.** New York: IBM Corp.
- Suzuki M, Lund CW (1980).** Improved gas-liquid chromatography for simultaneous determination of volatile fatty acids and lactic acid in silage. *J Agric and Food Chem*, 28, 1040-1041.
- Tepeli C (2014).** The Effects of Lactic Acid Bacterial Inoculants on the Fermentation, Aerobic Stability and *In Vitro* Organic Matter Digestibility of Sunflower Silages. Namık Kemal University, Graduate School of Natural and Applied Sciences Main Science Division of Animal Science. MSc. Thesis Tekirdağ-2014.
- Tüfekçi Ş (2023).** Ayçiçeği (*Helianthus annuus L.*) Bitkisi. Erişim tarihi: 13.11.2023 Erişim adresi: <https://docplayer.biz.tr/192125806-Aycicegi-helianthus-annuus-l-bitkisi.html>.
- TÜİK (2022).** Bitkisel üretim istatistikleri. Erişim tarihi: 28.02.2023 Erişim adresi: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2022-45504>.
- Yıldız S, Erdoğan S (2018).** Quality traits of the nutrient matter compositions and yield parameters of planted silage corn (*Zea mays L.*) and sunflower (*Helianthus annuus L.*) at conditions of Van. *Turk J Agric Res*, 5 (3), 280-285.
- Yıldız S (2017).** The Effect of Using Sunflower Silage Instead of Corn Silage in the Diets of Saanen X Hair Goat Crossbred (F1) Goats on Rumen and Blood Parameters, Milk Yield and Composition. Yüzüncü Yıl University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, PhD Thesis. Van, 2017.
- Yıldız S, Deniz S, Özkan F, Kale Ç (2022a).** Forage turnip (*Brassica rapa*) harvested in different phases of vegetative stage and ensiled with the additives of molasses and barley and the effects of additives on silage quality, *in vitro* digestibility, and energy content. *Turk J of Vet and Anim Sci*, 46 (3), 475-482.
- Yıldız S, Deniz S, Kızıllırmak F, Altaçlı S (2022b).** The effects of making silage at different ratios of sunflower and sugar beet on silage quality, *in-vitro* digestibility and energy content. *J of the Inst of Sci and Tech*, 12 (2), 1154-1162.



Farklı Dozlarda Uygulanan Streptozotocinin Sıçan Karaciğerine Etkilerinin Stereolojik Metotlarla İncelenmesi

Saadet YILDIZ^{1,*}  Murat Çetin RAĞBETLİ²  Yasin TÜLÜCE³ 

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Dursun ODABAŞI Tıp Merkezi, 65080, Van, Türkiye

²Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalı, 70200, Karaman, Türkiye

³Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, 65090, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 18.09.2023

Kabul Tarihi: 04.12.2023

ÖZ

Diabetes Mellitus, vücudun insülin üretememesinden veya insülin etkisine karşı dirençten veya her ikisinden kaynaklanan yüksek kan şekeri seviyeleri ile karakterize edilen bir grup kronik metabolik rahatsızlıktır. İnsülin, vücut dokuları ve organları tarafından glikoz üretimini ve kullanımını düzenleyen ana hormondur. Diyabet, karaciğer de dahil olmak üzere vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Streptozotocin, pankreas β-hücre yıkımı gerçekleştiren bir antibiyotiktir ve deneysel diyabet oluşturmak için yaygın olarak kullanılır. Bu çalışmada, sıçan karaciğerinde streptozotocin kaynaklı diyabetin neden olduğu morfometrik değişikliklerin hacim ve hücre sayılarının stereolojik yöntemler kullanılarak hesaplanması amaçlandı. Çalışmada erişkin 20 adet erkek sıçan kullanıldı. Rastgele dört grup oluşturuldu. Tüm grupların kan glikoz değerleri ölçüldü. Streptozotocinin farklı dozları (55 mg/kg ve 65 mg/kg) verilerek diyabet induklendi. 48 saat sonra tekrar kan glikoz değerleri ölçüldü. Dört hafta sonra kontrol ve denek gruplarına ait tüm sıçanların anestezi altında karaciğer dokuları çıkarılarak %10'luk formaldehitte tespit edildi. Tespit edilen karaciğer dokuları fiziksel fraksiyonlama ile eşit parçalara ayrıldı. Dehidratasyon aşamalarından geçerek parafinde sabitlendi. Histolojik kesitler hazırlandı. Hematoksilin-Eozin ile boyandı ve ışık mikroskopunda incelenerek fotoğraflandı. Cavalieri prensibi ile karaciğerin total hacmi, disektör yönteminin tarafsız sayım çerçevesi ile hepatosit sayıları hesaplandı. Diyabete bağlı gruplarda, kontrol grubuna göre karaciğer hacminde ve hücre sayısındaki artış anlamlıydı ($p < 0.05$). Sonuç olarak, streptozotocin enjeksiyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan diyabet, karaciğer hacminde ve hepatosit sayılarında artışa yol açmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Diyabet, Karaciğer, Sıçan, Streptozotocin.

ABSTRACT

Investigation of the Effects of Streptozotocin Applied in Different Doses on Rat Liver with Stereological Methods

Diabetes mellitus is a group of chronic metabolic conditions, all of which are characterized by elevated blood glucose levels resulting from the body's inability to produce insulin or resistance to insulin action, or both. Insulin is the main hormone that regulates glucose production and use by body tissues and organs. Diabetes affects all systems in the body, including the liver. Streptozotocin is an antibiotic that performs pancreatic β-cell destruction and is widely used to induce experimental diabetes. In this study; It was aimed to calculate the volume and cell numbers of the morphometric changes caused by streptozotocin-induced diabetes in the rat liver using stereological methods. Twenty adult male rats were used in the study. Four groups were created randomly. Blood glucose values of all groups were measured. Diabetes was induced by administering different doses of streptozotocin (55 mg/kg and 65 mg/kg). After 48 hours, blood glucose values were measured again. Four weeks later, liver tissues of all rats from the control and experimental groups were taken under anesthesia and fixed in 10% formaldehyde. The fixed liver tissues were divided into equal parts by physical fractionation. It was fixed in paraffin after passing through dehydration stages. Histological sections were prepared. It was stained with Hematoxylin-Eosin, examined under a light microscope and photographed. The total volume of the liver was calculated using the Cavalieri Principle and the number of hepatocytes was calculated with the unbiased counting frame of the disector method. In the diabetes-related groups, the increase in liver volume and cell number was significant compared to the control group ($p < 0.05$). As a result, streptozotocin injection and the resulting diabetes lead to an increase in liver volume and hepatocyte numbers.

Keywords: Diabetes, Liver, Rat, Streptozotocin.



GİRİŞ

Diabetes Mellitus (DM), dünya çapında görülen bulaşıcı olmayan bir hastalıktır. DM, tip 1 (DM1) veya tip 2 (DM2) olarak sınıflandırılır. DM1, pankreasın insülin hormonunu üretmeyi bırakması veya β hücrelerinin yok edilmesi nedeniyle ortaya çıkar. DM2 en yaygın tiptir ve diyabet vakalarının yaklaşık %90'ını temsil eder. İleri yaşta insanlarda ortaya çıkan bu türü, insülin direnci ve insülin salgılanmasındaki eksiklikten dolayı kan şekerinin yükselmesi ile kendini gösteren bir hastalıktır (Maitra ve Abbas 2005; Piya ve ark. 2010; Magalhaes ve ark. 2019). Bu metabolik hastalık, karaciğer de dahil olmak üzere vücuttaki tüm sistemleri etkiler. Esas olarak insülin direncinin neden olduğu hiperglisemi; lipidlerin, karbonhidratların ve proteinlerin metabolizmasını etkiler ve alkole bağlı olmayan yağlı karaciğer hastalığına yol açabilir, bu da alkole bağlı olmayan steatohepatit, siroz ve son olarak hepatosellüler karsinomlara ilerleyebilir (Al-Ani ve ark. 2009; Mohamed ve ark. 2016). Karaciğerin yağ metabolizmasını gerçekleştirmesi için uygun bir konsantrasyonda insülin gereklidir. Düşük üretim veya yetersiz eksojen insülin uygulaması yoluyla kandaki insülin konsantrasyonundaki herhangi bir değişiklik, karaciğerde yağ birikmesine neden olur (Lucchesi ve ark. 2015). Epidemiyolojik araştırmalar, dünya çapında 2019 yılında yaklaşık 463 milyon kişinin DM'den muzdarip olduğunu ve bu sayının 2030 yılına kadar 578 milyona çıkacağını göstermiştir (Saeedi ve ark. 2019).

Streptozotosin (STZ) deneysel diyabet oluşturan kimyasaldır. Pankreas β hücrelerinin yok edilmesine yol açar ve yetersiz insülin üretiminin doğrudan bir sonucu olarak hiperglisemiye neden olur (Correia-Santos ve ark. 2012; Kohl ve ark. 2013). 1963'ten beri STZ'in intraperitoneal (ip) veya intravenöz (iv) enjeksiyonun yapıldığı DM1 hayvan modeli yaygın olarak kullanılmaktadır (Wang-Fischer ve Garyantes 2018). STZ tek doz ip olarak 100 mg/kg uygulamasıyla, insülin bağımsız diyabet ve 40-60 mg/kg iv olarak uygulamasıyla insüline bağımlı diyabet oluşturur (Szkudelski 2001).

Steroloji metodu, hacim, yüzey alanı ve uzunluk ile doku, hücre veya organel sayısı hakkında tarafsız nicel morfolojik veriler elde etmek için kullanılır. Bunun için de biyolojik nesnelere mikroskopta nicel bir hesaplama ile matematiksel olarak türetilmiş modelleri kullanır. Bu metod çok çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılır ve sistematik, önyargısız doku örneklemesine izin verir (Ünal ve ark. 2002).

Bu çalışmada; STZ ile oluşturulan diyabetin sıçan karaciğerinde oluşturduğu morfometrik değişikliklerin stereolojik yöntemler kullanılarak hacim ve hücre sayılarının hesaplanması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan 25.03.2010 tarihinde 2010/03 sayılı izin alınarak yapılmıştır.

Deney Hayvanları

Çalışma için kullanılan hayvanlar Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden temin edildi. Ağırlıkları 200 ila 300 g arasında değişen sekiz-on iki haftalık erkek sıçanlardan 20 adet kullanıldı. Kafeslerde, ortalama 22 °C sıcaklıkta, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsü ile barındırıldılar. Serbest olarak filtrelenmiş musluk suyu ve sıçan yemi ile beslendiler.

Deneyin Uygulanması

Hayvanlar randomize olarak her biri beş sıçandan oluşan dört gruba ayrıldı. Deneyden önce tüm grupların açlık kan glikoz değerleri alınarak kaydedildi. Denek gruplarına sodyum sitrat tamponu (pH:4.5) içinde çözündürülmüş STZ (Sigma- Aldrich, USA) dozları (55 mg/kg, 65 mg/kg) hazırlandı.

Kontrol: Herhangi bir işlem uygulanmadı.

Sham: 0.5 ml serum fizyolojik (SF)

Denek 1: 0.5 ml 55 mg/kg STZ (Szkudelski 2001; Al-Ani ve ark. 2009)

Denek 2: 0.5 ml 65 mg/kg STZ (Szkudelski 2001; Al-Ani ve ark. 2009)

STZ'nin ip enjeksiyonundan 48 saat sonra tüm hayvanların açlık kan glikoz değerleri tekrar ölçüldü. Glikoz değeri \geq 200 mg/dl olanlar diyabetik olarak kabul edildiler.

Dokuların Hazırlanması

Deney başladıktan dört hafta sonra tüm sıçanlara anestezi (ketalar, 50 mg/kg) altında perfüzyon uygulanarak, karaciğerleri alındı. Karaciğer dokuları 24 saat boyunca %10'luk nötr tamponlu formaldehitte sabitlendi.

Stereolojik İşlemler

Tespit edilen karaciğer dokuları eşit parçalara ayrıldı. (Şekil 1).



Şekil 1: Sıçan karaciğerinin lobları ve fiziksel fraksiyonlama.

Figure 1: Lobes of rat liver and physical fractionation.

Sistematik ve rastgele olarak seçilen her bir karaciğer parçası 1/12 oranında örneklendi (f1). Örneklenen her bir parça doku takip prosedürleri izlenerek parafin bloklara gömüldü. Bloklanan dokularda mikrotom yardımıyla 5 μ m kalınlığında kesitler alınarak 1/400 (f2) oranında ardışık olarak çiftler halinde alındı. Alınan kesitler Hematoksilin-Eozin boyası ile boyandı ve mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Karaciğer dokusunun hacim ölçümü için Cavalieri Prensipli (CP) metodu kullanılarak volüm hesaplandı.

$$V = t \times a/p \times P \quad (1)$$

V: Volüm, **t:** Kesit kalınlığı, **a/p:** Nokta sayma tablosundaki her noktanın temsil alanıdır, **P:** Bölümlerin yüzey alanlarına temas eden noktaların toplam sayısı.

$$\text{Total Volüm} = V_1 + V_2 + \dots + V_n \quad (2) \quad (\text{Mazonakis ve ark. 2002}).$$

Her kesit için ayrı ayrı hesaplanan hacimler toplanarak karaciğerin total hacmi bulundu.

Işık mikroskobunda 100'lük büyütmede fotoğraflar çekilerek sayısal yoğunluk hesaplama formülü yardımıyla karaciğer hücreleri hesaplandı. Burada ise Alan Örnekleme Payı, 1/800 (f3) oranında yapıldı (Gundersen 1986).

Böylece elde edilen disektör taneciklerinin sayısı (Q), önceki taneciklerin ters orantısıyla çarpılarak toplam sayı (N) hesaplandı (Gundersen ve Jensen 1987; Ünal ve ark. 2002).

$$N = \frac{1}{f_1} \cdot \frac{1}{f_2} \cdot \frac{1}{f_3} \dots \frac{1}{f_n} \cdot \Sigma Q$$

İstatistiksel Analiz

İstatistik hesaplamalar SPSS (ver: 13) paket programında yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlendi. Tüm veriler minimum, maksimum, standart sapma ve ortalama değerler olarak hesaplandı. Bu değişkenler için Normallik testi, Shapiro Wilk testi kullanılarak yapıldı. Normallik varsayımı sağlanmadığından, grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Farklı grupları belirlemede, Dunn testi kullanıldı.

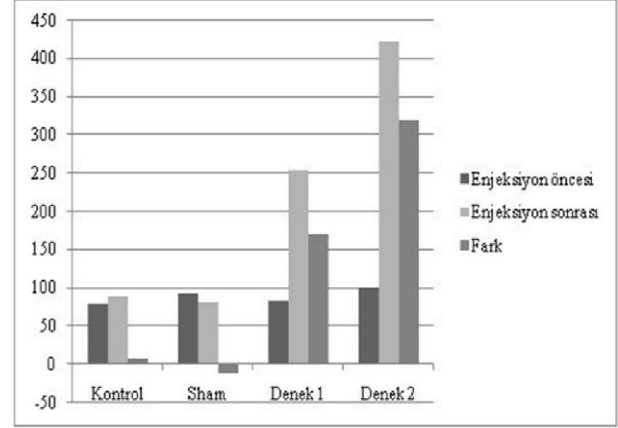
BULGULAR

STZ enjeksiyonundan 48 saat sonra denek gruplarında ölçülen kan glikoz değerlerinde yükselme görüldü (Şekil 2).

Histopatolojik Bulgular

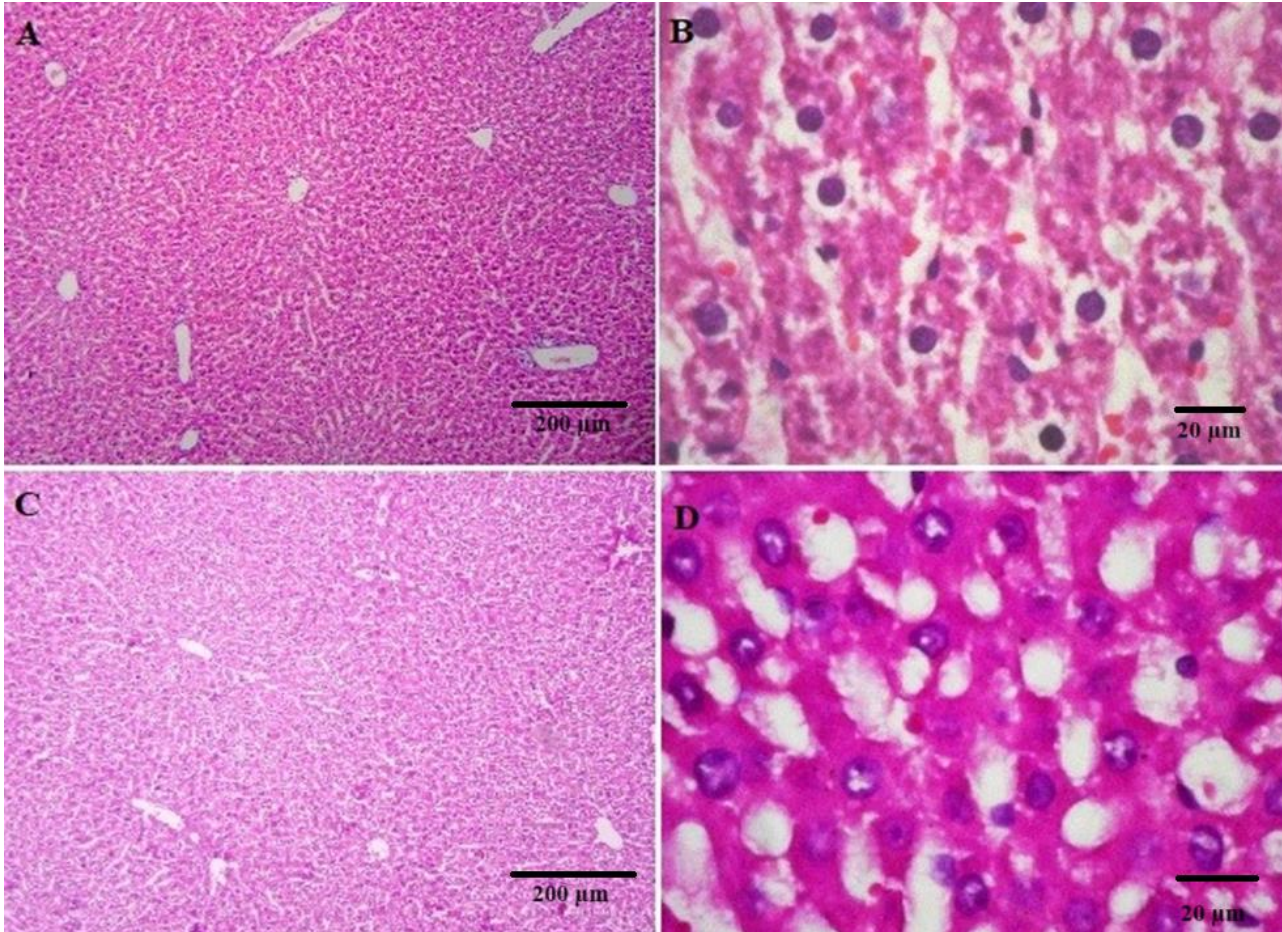
Kontrol ve sham grubu sıçanlarının HE ile boyanmış karaciğer bölümleri, hepatik lobüllerden oluşan normal hepatik yapıya sahipti. Buna karşılık STZ'in neden olduğu

diyabetik sıçanların karaciğer yapısında portal triad çevresinde inflamasyonun yanı sıra nekrotik değişiklikler ve karaciğer parankiminde kan sinüzoidlerinde hafif genişleme görüldü. Ayrıca hepatositlerde mikrovaziküler yağlanma belirgindi. Bazı nukleuslar olduğundan büyük, deforme olmuş, bazılarının da çekirdek zarı sınırlarının düzensiz görünümü hakimdi (Şekil 3).



Şekil 2: Grupların ortalama glikoz düzeyleri (mg/dl).

Figure 2: Mean glucose levels of the groups (mg/dl).

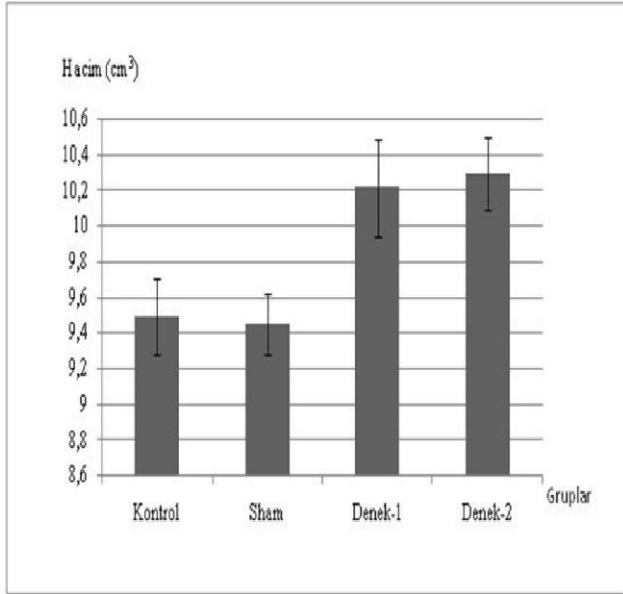


Şekil 3: A: Kontrol, HE_x10, B: Kontrol, HE_x100, C: Denek 2, HE_x10, D: Denek 2, HE_x100 gruplarının mikroskopik görüntüleri.

Figure 3: A: Control, HE_x10, B: Control, HE_x100, C: Subject 2, HE_x10, D: Subject 2, HE_x100. microscopic images of groups.

Stereolojik ve İstatistik Bulgular

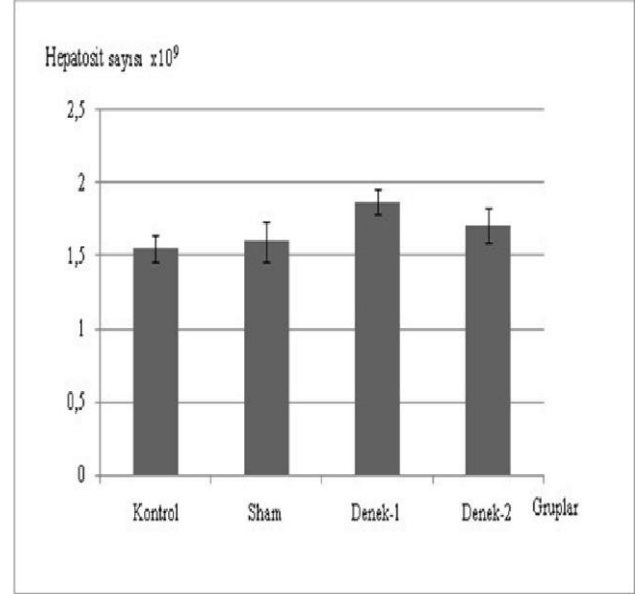
CP göre diyabet gruplarının karaciğer volumü kontrol ve sham gruplarına göre anlamlı bir fark gösterdi ($p<0.05$) (Tablo 1, Şekil 4).



Şekil 4: CP ile karaciğer hacimleri.

Figure 4: Liver volumes with CP.

Tüm gruplardaki hepatosit sayısına bakıldığında, gruplar arasında fark anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 1). Diyabet grubu hepatosit sayısında artış görüldü (Şekil 5).



Şekil 5: Hepatositlerin sayısı.

Figure 5: The number of hepatocytes.

Tablo 1: Hacim ve hücre sayısının gruplara göre istatistik analizi.

Table 1: Statistical analysis of volume and cell number according to groups.

	Gruplar	Sayı	Ortalama	Std. Sapma	Min.	Mak.	p
Karaciğer hacmi (cm³)	Kontrol	5	9.49 ^b	0.210	9E+012	1E+013	0.001
	Sham	5	9.45 ^b	0.176	9E+012	1E+013	
	Denek-1	5	10.21 ^a	0.274	1E+013	1E+013	
	Denek-2	5	10.29 ^a	0.209	1E+013	1E+013	
Hepatosit Sayısı (10 ⁹)	Kontrol	5	1.55 ^c	0.092	1E+009	2E+009	0.002
	Sham	5	1.60 ^{bc}	0.144	1E+009	2E+009	
	Denek 1	5	1.87 ^a	0.097	2E+009	2E+009	
	Denek 2	5	1.71 ^b	0.120	2E+009	2E+009	

a, b, c: Gruplardaki harfler anlamlılık düzeyini göstermektedir ($p<0.05$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

STZ ile indüklenen DM, kemirgenlerin çoğu türünde kullanılabilen çok uygun maliyetli ve hızlı bir teknik sunarak, DM'un araştırma alanını başka türlü erişilemeyecek bir dizi genotipik ve fenotipik seçeneğe açar. Sıklıkla tek bir yüksek dozda STZ uygulanarak 48 saat içinde tam β -hüresi nekrozu ve Tip-1 diyabete, çoklu düşük dozlu STZ yaklaşımı ise pankreas adacıklarına kısmen zarar verdiği ve sonuçta insülin eksikliği ve hiperglisemiyle sonuçlanan β hüresi aktivitesinin daha da kaybolmasına neden olan inflamatuvar bir süreci tetiklediği bildirilmiştir. Spesifik deneysel protokol için amaçlanan diyabetin tipine ve ciddiyetine bağlı olarak literatürde birden fazla STZ dozlama yöntemi mevcuttur (Alberti 2010; Deeds ve ark. 2011; Furman 2021). DM sıçanlarda kan glikozu, su alımı, gıda alımı ve glikat hemoglobinde anlamlı artış, plazma insülini, toplam hemoglobin, vücut

ağırlığı ve karaciğer glikojenin de belirgin azalma görüldüğü bildirilmiştir (Punithavathi ve ark. 2008). 50 mg/kg STZ ile oluşturulan DM grubu sıçan hepatositlerde yaygın dejenerasyon ve nekroz ile periasiner bölgede hepatositlerin sitoplazmasındaki değişiklikler bildirilmektedir (Yaman ve Doğan 2016). 50 mg/kg STZ ile diyabet oluşturulan sıçan karaciğerinde, nekroz, şiddetli inflamatuvar hücre infiltrasyonu, yağ değişimi, sinüzoidal dilatasyon ve tıkanıklık gibi birçok geniş alan saptanmıştır (Balasubramanian ve ark. 2013). Alshathly (2019)'nin yaptığı çalışmada da diyabetik sıçanlarda kan sinüzoidlerinde hafif genişleme görüldüğü, santral damara yakın hepatositlerde mikrostatlarda gözlendiği, hepatosit çekirdeklerinin deforme olduğu ve koyu lekelenildiği ayrıca artan fibröz doku ile portal damarlar genişlediği ve hücre infiltratları ile çevrelediği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada (STZ 40 mg/kg) diyabetik kontrol sıçan karaciğerinde, hücreler arası sinüzoidlerin genişlemesi ve merkezi damarda tıkanıklık ile birlikte hipertrofik hücreler, ilthaplanma sergilenmiştir

(Chandrasegaran ve ark. 2018). 60 mg/kg STZ ile indüklenen ve kontrol grubuna kıyasla tedavi edilmemiş diyabetik farelerde hepatositler, merkezi damarlar, sinüzoidler, portal damarlar, hepatik arterler ve safra kanallarının hacimlerinin arttığı ve dolayısıyla karaciğerin ağırlığında ve hacminde artışa yol açan önemli bir hipertrofiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Zangeneh ve ark. 2018). Zheng ve ark. (2021), 60 mg/kg STZ verdikleri ve tedavi etmedikleri diyabetik sıçanlarda karaciğer ağırlığı ve hacminin yanı sıra hepatositlerin ve sinüzoidlerin toplam hacminin önemli ölçüde arttığını saptamışlardır. Ayrıca patolojik olarak, hepatoselüler steatoz, lobüler inflamasyon ve siroz dahil olmak üzere değişen derecelerde periselüler, perisinüzoidal ve periporta fibrozis varlığını teşhis etmişlerdir. STZ ile indüklenen diyabet modelinde sıçan kan ve karaciğerinde biyokimyasal değişikliklere neden olduğu, bu değişikliklerin insan karaciğerindeki benzer modifikasyonlar gibi steatozdan steatohepatite ve karaciğer fibrozuna kadar değişebilen etkiler gösterebildiği bildirilmiştir (Bilal ve ark. 2016). Tek bir doz STZ (150 mg/kg, ip) uygulandığında karaciğer ağırlığının yüzdesinde artış, glikojen azalması, lipid birikimi, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kupffer hücre hiperplazisi görülmüştür (Al-Ani ve ark. 2009).

Optik disektör sayma yöntemi kullanılarak hepatositlerin sayısının değerlendirildiği bir çalışmada diyabetik olmayan sağlıklı grup ile karşılaştırıldığında diyabetik kontrol grubunun hepatosit sayılarında artış olduğu saptanmıştır. Bunun nedeni, daha yüksek bir hepatosit sayısının diyabetik karaciğerlerde aşırı glikoz üretimine neden olması ve fazla glikozun diğer organlar tarafından verimsiz bir şekilde metabolize edilmesi olabileceğini vurgulamışlardır (Sipal ve ark. 2012). Aynı şekilde Ünal ve ark. (2011) diyabetik grupta hepatositlerin sayısında %21'lik bir artış tespit etmişlerdir. Yine başka bir çalışmada DM, hepatositlerin hem sayısında hem de hacminde artışa neden olmuştur. Enerji dengesizliğini düzenlemek için DM'un insüline dirençli durumlarda, hepatik hiperplazi olarak bilinen bir durumda hepatosit sayısının arttığı iddia edilmiştir. Artan hücre sayısının sadece apoptoz yüklü olabilen trofik faktörü azaltmakla kalmayıp, aynı zamanda ana oksidan kaynakları olan mitokondri sayısında da artışa neden olduğu vurgulanmıştır (Halici ve ark. 2009).

Sonuç olarak, streptozotosin enjeksiyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan diyabet, karaciğer hacminde ve hepatosit sayılarında artışa yol açmaktadır. Bu değişiklikler diyabetli hastalarda karaciğerde meydana gelen değişikliklerin anlaşılmasına yardımcı olur.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışmada herhangi bir finansal destek alınmamıştır. Bu çalışma Saadet YILDIZ isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Bu çalışma 5. Uluslararası Tıp Bilimleri ve Multidisipliner Yaklaşımlar isimli kongrede sözlü sunu olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır (8-9 Ekim 2022. Online, İstanbul, Türkiye. Özet Kitabı: ss: 486).

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MÇR, SY
Denetleme/Danışmanlık: MÇR, YT
Veri Toplama ve/veya İşleme: MÇR, SY, YT
Analiz ve/veya Yorum: MÇR, SY, YT
Makalenin Yazımı: SY, YT
Eleştirel İnceleme: MÇR, SY, YT

KAYNAKLAR

- Al-Ani IMD, Al-Mishadani NMS, Muslih RK, Hamoodi SR (2009).** Histological liver changes in streptozotocin induced diabetic mice. *Med J Malaysia*, 8 (1).
- Alberti KGMM (2010).** The classification and diagnosis of diabetes mellitus. Holt R, Cockram C, Flyvbjerg A and Goldstein B (Ed). *Endocrinology and Metabolism* (pp. 24-30). Blackwell Publishing, London, UK.
- Alshathly MR (2019).** Efficacy of Ginger (*Zingiber officinale*) in ameliorating streptozotocin-induced diabetic liver injury in rats: Histological and biochemical studies. *J Microsc Ultrastruct*, 7 (2), 91-101.
- Balasubramanian T, Senthilkumar GP, Karthikeyan M, Chatterjee TK (2013).** Protective effect of ethyl acetate fraction of stereo spermum suaveolens against the hepatic oxidative stress in STZ diabetic rats. *J Tradit Complement Med*, 3 (3), 175-181.
- Bilal HM, Riaz F, Munir K, Saqib A, Sarwar MR (2016).** Histological changes in the liver of diabetic rats: A review of pathogenesis of non alcoholic fatty liver disease in type 1 diabetes mellitus. *Cogent Medicine*, 3 (1), 1275415.
- Chandrasegaran G, Elanchezhian C, Ghosh K (2018).** Effects of Berberine chloride on the liver of streptozotocin-induced diabetes in albino Wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 99, 227-236.
- Correia-Santos AM, Suzuki A, Anjos JS et al. (2012).** Induction of Type 2 Diabetes by low dose of streptozotocin and high-fat diet-fed in wistar rats. *Medicina (Ribeirao Preto)*, 45 (4), 436-444.
- Deeds MC, Anderson JM, Armstrong AS et al. (2011).** Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. *Lab Anim*, 45 (3), 131-140.
- Furman, BL (2021).** Streptozotocin-induced diabetic models in mice and rats. *Curr Protoc.*, 1 (4), e78.
- Gundersen HJG (1986).** Stereology of arbitrary particles a review of un biased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of william r. thompson. *J Microsc*, 143 (1), 3-45.
- Gundersen HJG, Jensen EB (1987).** The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc*, 147 (3), 229-263.
- Halici Z, Bilen H, Albayrak F et al. (2009).** Does telmisartan prevent hepatic fibrosis in rats with alloxan-induced diabetes? *Eur J Pharmacol*, 614 (1-3), 146-152.
- Kohl T, Gehrke N, Schad A et al. (2013).** Diabetic liver injury from streptozotocin is regulated through the caspase-8 homolog CFLIP involving activation of JNK2 and intrahepatic immunocompetent cells. *Cell Death Dis*, 4 (7), e712.
- Lucchesi AN, Cassettari LL, Spadella CT (2015).** Alloxan-induced diabetes causes morphological and ultrastructural changes in rat liver that resemble the natural history of chronic fatty liver disease in humans. *J Diabetes Res*, 2015, 494578.
- Magalhaes DA, Kume WT, Correia FS et al. (2019).** High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc*, 91 (1), e20180314.
- Maitra A, Abbas AK (2005).** The endocrine pancreas. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*, 7th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia. 1190-1205.
- Mazonakis M, Damilakis J, Maris T, Prassopoulos P, Gourtsoyannis N (2002).** Comparison of two volumetric techniques for estimating liver volume using magnetic resonance imaging. *J Magn Reson Imaging*, 15 (5), 557-563.
- Mohamed J, Nafzah AN, Zariyantey AH, Budin S (2016).** Mechanisms of diabetes-induced liver damage: the role of oxidative stress and inflammation. *Sultan Qaboos Univ Med J*, 16 (2), e132.
- Piya MK, Tahrani AA, Barnett AH (2010).** Emerging Treatment Options for Type 2 Diabetes. *Brit J Clinical Pharma*, 70 (5), 631-644.
- Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PSM (2008).** Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male wistar rats. *J Appl Toxicol*, 28 (6), 806-813.
- Saeedi P, Petersohn I, Salpea P et al. (2019).** Diabetes Atlas Committee. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and

- projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas. *Diabetes Res Clin Pract*, 157, 107843.
- Sipal S, Halici Z, Kiki I et al. (2012).** Comparative study of three angiotensin II type 1 receptor antagonists in preventing liver fibrosis in diabetic rats: stereology, histopathology, and electron microscopy. *J Mol Histol*, 43 (6), 723-735.
- Szkudelski T (2001).** The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiol Res*, 50 (6), 537-546.
- Unal D, Aksak S, Halici Z et al. (2011)** Effects of diabetes mellitus on the rat liver during the postmenopausal period. *J Mol Histol* 42 (3), 273-287.
- Ünal B, Canan S, Aslan H, ve ark. (2002).** Doku örneklerindeki objelerin sayılarının hesaplanmasında tarafsız stereolojik metodlar: Fiziksel disektör. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 15-24.
- Wang-Fischer Y, Garyantes T (2018).** Improving there liability and utility of streptozotocin-induced rat diabetic model. *J Diabetes Res*, 2018, 8054073, 14 pages.
- Yaman T, Doğan A (2016).** Streptozotosin ile diyabet oluşturulan sıçanlarda meşe palamudu (*quercus brantii* L.) ekstraktlarının karaciğer ve pankreası koruyucu etkileri. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, 1, 7-15.
- Zangeneh MM, Zangeneh A, Bahrami E et al. (2018).** Evaluation of hematoprotective and hepatoprotective properties of aqueous extract of *Ceterach officinarum* DC against streptozotocin-induced hepatic injury in male mice. *Comp Clin Pathol*, 27 (6), 1427-1436.
- Zheng Y, El-kott AF, Shaldoum F et al. (2021).** Alleviation of Diabetes-Induced Hepatotoxicity by Date Palm Hydroalcoholic Extract in Rat Model; A Biochemical, Immunohistochemical and Stereological Study. *Int J Morphol*, 39 (3), 876-885.



Immunohistochemical Investigation of Autophagy in the Uterus during the First Trimester of Pregnancy in Rats

Dilara USLU¹ Sema USLU^{2,*}

¹Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, 58140, Sivas, Türkiye

²Sivas Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology, 58140, Sivas, Türkiye

Received: 30.10.2023

Accepted: 26.01.2024

ABSTRACT

During placental development, autophagy has an important role at the molecular level, especially in cases such as trophoblast cell proliferation and cell death. Abnormal placental development due to trophoblast dysfunction causes serious gynaecological diseases and various fetal malformations. In the study conducted to investigate autophagy on the 5th day of pregnancy, in the pregnant and non pregnant group uterus tissues, uterine glands LC3 and Beclin 1 (+), in the evaluation of myometrium and perimetrium, weak (+) was observed in myometrium cells in pregnancy, while (+) reaction could not be distinguished in perimetrium. In this study, it was concluded that the immunohistochemical increase in LC3 and Beclin 1 intensity in the uterus, especially in the endometrial areas in the first trimester of pregnancy compared to the control group tissues is related to the physiology of pregnancy, homeostasis in pregnancy and hormonal mechanism.

Keywords: Autophagy, Beclin1, LC3, Pregnancy, Rat, Uterus.

ÖZ

Ratlarda Gebelikte Birinci Trimesterde Uterusta Otofajinin İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması

Plasental gelişim sırasında otofaji, özellikle trofoblast hücre proliferasyonu ve hücre ölümü gibi durumlarda moleküler düzeyde önemli bir role sahiptir. Trofoblast disfonksiyonuna bağlı anormal plasental gelişim, ciddi jinekolojik hastalıklara ve çeşitli fetal malformasyonlara neden olmaktadır. Gebeliğin 5. gününde otofajiyi araştırmak için yapılan çalışmada gebe ve gebe olmayan grupta uterus dokularında, uterus bezlerinde LC3 ve Beclin 1 (+), myometrium ve perimetriumun değerlendirilmesinde gebelikte myometrium hücrelerinde zayıf (+) gözlenirken, perimetriumda (+) reaksiyon ayırt edilememiştir. Bu çalışmada, kontrol grubu dokularına kıyasla gebeliğin ilk trimesterinde uterusta, özellikle endometrial alanlarda LC3 ve Beclin 1 yoğunluğundaki immünohistokimyasal artışın gebelik fizyolojisi, gebelikteki homeostaz ve hormonal mekanizma ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Beclin1, Gebelik, LC3, Otofaji, Rat, Uterus.

INTRODUCTION

Autophagy means self-digestion, derived from the roots of auto (self) and phagy (eat). Autophagy is the process of catalyzing degraded parts, waste molecules and metabolic parts within the cell by lysosomes (Ozpolat and Benbrook 2015). Dysfunction of autophagy is an underlying mechanism for neurodegenerative transmission, muscle diseases, cancer and heart diseases. During autophagy, double-membrane autophagosomes are formed to catabolize intracellular components, including organelles such as mitochondria. Autophagosomes fuse with lysosomes to form autolysosomes and are degraded by lysosomal hydrolases (Rubinsztein et al. 2005; Deretic et al. 2006; Munz 2006; Wileman 2006).

Autophagy is activated by other physiological stresses

such as hypoxia, energy depletion, endoplasmic reticulum stress, high temperature, hormonal stimulation, various pharmacological agents and innate immune signals, as well as in diseases such as bacterial, viral and parasitic infections, acute pancreatitis, heart disease and protein aggregopathies. In contrast, autophagy suppression is frequently associated with some diseases, such as a subset of cancers, neurodegenerative diseases, infectious diseases, and intestinal inflammation, and decline in autophagy function is the most frequently observed feature of aging (Eskelinen 2005).

It is emphasized that autophagy is especially stimulated by starvation, electromagnetic radiation, stress, endoplasmic reticulum (ER) stress and chemotherapeutic agents (Yoshida 2017). The continuity of basal autophagy and cytoplasmic contents during the growth and development



process is very important for the continuity of cell physiology. It appears that autophagy is very important during cell development (Al Rawi et al. 2011; Sato and Sato 2011). After fertilization, autophagy destroys spermatozoon mitochondria together with the ubiquitin-proteasome system, which leads to heteroplasmy (Song et al. 2016). By focusing on maternal mRNA and proteins that might be necessary for the zygotic process, autophagy exhibits considerable activity after the two-cell late stage (Stitzel and Seydoux 2007). According to Di Bartolomeo et al. (2010), autophagy is also essential for the development of pre-implantation embryos, cell differentiation, and organogenesis. Autophagy helps mature erythrocytes get rid of organelles like ribosomes and mitochondria that aren't needed for cell activity (Mortensen et al. 2010).

Autophagy-related proteins (Atg proteins) were first detected in studies conducted in yeast, and more than 30 Atg genes were found (Xie and Klionsky 2007). A portion of these proteins aid in the development of autophagosomes. Pre-autophagosomal structures (PAS) are the structures in which autophagosomes develop. There are four phases that form the autophagy mechanism. 1. The mTor complex, which is the Atg1-Atg13-Atg17 kinase complex 2. Complex PIP3: Atg6 (Beclin 1) complex, which regulates the activity of Vps34 3. Ubiquitin-like system 4. Atg9 and the cycle system After these steps, autophagy in the cell; It progresses as nucleation, membrane elongation, fusion with lysosome and destruction (Arslan et al. 2011).

The mTor pathway is responsible for initiating autophagy in response to starvation conditions in the cell. Accumulation of intracellular free radicals, lack of amino acids and low amount of ATP inhibit the mTor pathway. Following these events, Unc51-like kinase (ULK1) is activated. Beclin 1 serves as a substrate of ULK1; On the other hand, by attaching to Beclin 1, the anti-apoptotic protein B-cell leukemia/lymphoma (Bcl-2) prevents autophagy (Kim et al. 2002). In mammalian cells, Vps34 initiates autophagosome formation, and especially the dissociation of Beclin 1 and Beclin 2 is the most fundamental event for autophagic activity. The Atg12/Atg5/Atg16 complex and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3A/B-LC3I/II) protein complexes control the elongation of autophagosomes (Mooren and Krüger 2015). The mTor mechanism in cells is regulated by the Beclin 1, Beclin 2, LKB1-AMPK-mTor, P53, and PI3K-Akt-mTor pathways (Chen et al. 2010). Each gene plays a role in different steps of autophagy. LC3 is one of these genes. LC3-1 is located in the cytoplasm and is 18 kDa, while LC3-II is located on the outer surface of the autophagy membrane and is 16 kDa (Yang et al. 2005). Beclin 1 is expressed in human tissues and located in the endoplasmic reticulum, mitochondria and perinuclear space. Moreover, double-membrane autophagosomes, which are essential for autophagy, are formed by Beclin 1. Human prostate, ovarian, and breast cancers are caused by loss of Beclin 1 (Aita et al. 1999).

Autophagy has an important role at the molecular level during placental development, especially in situations such as proliferation of trophoblast cells and cell death (Gong and Kim 2014). Abnormal placental developments due to trophoblast dysfunction cause serious gynecological diseases and various fetal malformations (Fisher 2015).

The aim of this study was to determine the distribution of autophagy markers LC3 and Beclin 1 in the uterus on day 5 of gestation and to examine their development during pregnancy.

MATERIAL AND METHODS

Ethical Approval

Approval was obtained from Sivas Cumhuriyet University Animal Experiments Local Ethics Committee with the decision numbered 65202830-050.04.04-662 dated 16.06.2022; The study was conducted in accordance with the ethics committee guidelines.

Establishment of Experimental Groups and Experimental Protocol

The animal material used in the study was 60-day-old twelve female Wistar Albino Rats obtained from Sivas Cumhuriyet University Experimental Animals and Experimental Research Center. The rats were divided into the nonpregnant (control) group and the pregnant group, with 6 animals for each group. Animals in each cage were housed under 12-hour light/12-hour dark cycle at a temperature of 22 ± 2 °C. Rats were given ad libitum access to food and water.

The female animals in the group to be pregnant were kept in separate cages for one night, with one male animal each female (to increase the possibility of mating). Afterwards, swabs taken from female animals were examined by vaginal cytology method. Swab samples taken according to this method were transferred to the slide and fixed in methyl alcohol for 3 minutes. Air-dried slides were stained with toluidine blue for 10 minutes. Animals with spermatozoa in the examined preparations were accepted on day 0 of pregnancy. The animals that reached the 5th day of pregnancy and the control group animals were decapitated and their uteruses were removed.

After being fixed in 10% neutral buffered formaldehyde (Formaldehyde Merck: 103999; Distilled Water; NaH₂PO₄·H₂O; Na₂HPO₄ Sigma-Aldrich) for 24 hours, the uteruses went through routine tissue tracing stages and were embedded in paraffin blocks (Paraplast Plus, Sigma: P3683). Serial sections of 5µ thickness were taken from the prepared paraffin blocks with the help of a microtome (Leica RM 2125).

Immunohistochemistry

The prepared sections were placed on adhesive slides and the strept avidin-biotin complex (sABC) staining method was applied to determine the distribution and density of LC3 and Beclin-1 in the sections. After the sections were deparaffinized in xylene (Xylene-Merck Millipore: 108661) and dehydrated in alcohol series, the antigen retrieval process was started. For antigen retrieval, the slides were immersed in a 10-fold diluted citrate buffer (Citrate Buffer Heat-Induced Epitope Retrieval pH: 6 Thermo Scientific: AP- 9003-999) solution and boiled in a microwave oven at 800 watts for 20 minutes. After this process, the sections were cooled for 20-30 minutes, washed in Phosphate buffered saline (PBS Sigma: P4417) solution for 15 minutes, and then incubated in 3% hydrogen peroxide (Hydrogen peroxide 30% Merck: 108597) solution in the dark for 20 minutes to block endogenous peroxidase activity. When the incubation was completed, the sections were washed again with PBS solution for 15 minutes and then treated with 0.2% Triton X 100-PBS solution for 15 minutes to help the primary antibody pass through the cell membrane. After this stage, to prevent nonspecific antibody binding, Ultra Vision Block (UltraVision™ - Ultra V Block, Large Volume Detection System anti-Polyvalent, HRP (Ready-To-Use) Thermo Scientific: TP-060-HL) solution was dropped on the tissues and waited for 10 minutes, then diluted without washing. (Large Volume UltraAb Diluent Plus Thermo Scientific: TA-125-UDX) was

incubated with the primary antibody at 4 °C overnight. As primary antibody, LC3 (Proteintech-14600-1-AP) was applied at 1/100 dilution and beclin-1 (Afbiochem-AF5128) was applied at 1/100 dilution. After the primary antibody incubation, the sections were washed with PBS for 15 minutes and subjected to routine immunohistochemistry and AEC chromogen (AEC Substrate System Thermo Scientific: TA-060-HA) was used to demonstrate the reaction. Sections counterstained with Gill's hematoxylin were covered with water-based covering medium (Lab Vision™ Vision Mount Thermo Scientific: TA-125-UG) and examined under a microscope. In the negative control, after protein blocking, PBS was used instead of primary antibody and the tissues were incubated with this solution overnight. Immunohistochemical staining results were evaluated semiquantitatively and presented in tabular form. The staining intensity was graded from 0 to 3 (0 being no staining, 1 being faint staining, 2 being moderate staining, and 3 being high staining (Tatar et al. 2023).

RESULTS

The uteruses of the control group were taken and evaluated on the 5th pregnancy day. LC3 and Beclin-1 stainings were evaluated in terms of staining intensity and staining distribution. A semiquantitative evaluation was

made in tabular form by examining the endometrium, myometrium and perimetrium sections of the uterus. The lamina epithelialis and lamina propria in the endometrium, smooth muscles in the myometrium and perimetrium were evaluated without stratification. Lamina epithelialis and subepithelial area, stratum functionalis and stratum basalis in lamina propria and stratum vascularis in myometrium were examined. Endometrial epithelium was clearly distinguished in LC3 and Beclin 1 staining in the control group and tissues taken from the 5th day of pregnancy. In the 5th day of pregnancy staining, more intense staining was observed in the preparations examined than in the control groups. Cells with LC3 and Beclin1 (+) reactions were identified in the decidual cells found in the lamina propria (Figure 1). Uterine glands distinguished in the control group and pregnant uterine tissues were detected as having LC3 and Beclin 1 (+) reactions in all groups. In the evaluation of the myometrium and perimetrium, weak staining was observed in the myometrium cells during pregnancy, while a (+) reaction could not be distinguished in the perimetrium.

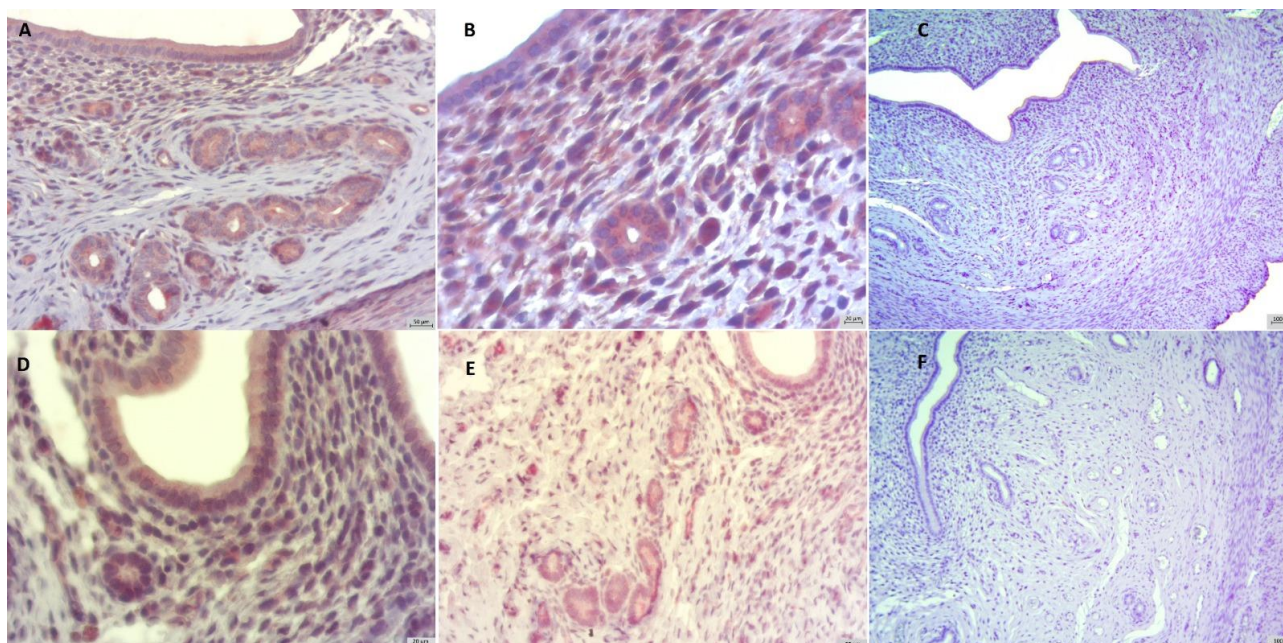


Figure 1: A: Uterus pregnancy day 5 Beclin 1 (Bar: 50 µm). B: Uterus pregnancy day 5 LC3 (Bar: 20 µm). C: Uterus negative control (Bar: 100 µm). D: Uterus control Beclin 1 (Bar: 20 µm). E: Uterus control LC3 (Bar: 50 µm). F: Uterus negative control (Bar: 100 µm).

Table 1: Semiquantitative score table.

		LC3 Control	LC3 Day 5.	Beclin1 Control	Beclin1 Day 5.
Endometrium	L. Epithelialis	++	+++	++	+++
	L. Propria	++	++	++	+++
Myometrium	Musculus	+/-	+/-	+/-	+/-
	Vascularisation in St. Vasculare	+/-	+/-	+/-	+/-
Perimetrium	-	-	-	-	-

DISCUSSION AND CONCLUSION

Autophagy is the process by which autophagosomes and lysosomes break down a portion of the cytoplasm to carry out homeostatic tasks. Autophagy includes processes whose stages have been recently investigated and the molecular mechanisms in the stages have been tried to be revealed (Chifenti et al. 2013). Autophagy involves a series of interrelated products. LC3 is one of the proteins that has two forms, conjugated and cytosolic, which are necessary for the final autophagosome formation. Beclin-1, on the other hand, regulates the autophagic mechanism with its interactions and, unlike LC3, which is the final autophagosome formation marker, is associated with proteins that participate in the nucleation of the autophagic vesicle in the early stages of autophagy, and plays a role in many biological events such as stress adaptation, endocytosis, development, tumor formation, aging and cell death is another protein (Wirawan et al. 2012). In this study, it is thought that the selection of these two proteins, which have very important roles in the autophagic mechanism, will support the revealing of the biological mechanism that occurs in the placenta, a temporary organ structure that provides immune support and is vital for the fetus in many mammalian species, including humans. In humans, LC3 and Beclin 1 activities were investigated in cells identified as syncytiotrophoblasts, cytotrophoblasts, and stromal cells in the first trimester of pregnancy, and the connection between preeclampsia, intrauterine period, and autophagy was revealed (Oh et al. 2008; Curtis et al. 2013). In this study, uterine samples taken on the 5th day of pregnancy in rats were examined, and LC3 and Beclin 1 activities were investigated immunohistochemically and semiquantitative evaluations were made. Chifenti et al.'s (Chifenti et al. 2013) study revealed that autophagy increased compared to the control group, in parallel with the results of Western Blot studies in humans. The increase in autophagic activation and the similarity of LC3 and Beclin 1 immune localization reveal that autophagy may play a control role in intrauterine development in the first trimester. Factors such as trimesters of pregnancy and the age of the mother may change autophagic needs during pregnancy. Distribution variability between cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts may also differ depending on the gestational period of autophagy. It is thought that the distribution of LC3 and Beclin 1 will vary according to the gestational period, but may be higher in the first trimester, early placentation, and the distribution of immune reactions in the endometrial glands due to the more effective microenvironmental factors.

In the third trimester of a typical pregnancy, Yang et al. (2020) looked into the impact of nutritional support on the levels of LC3 and Beclin 1. They found that although Beclin 1 did not change statistically, the amounts of LC3 increased with nutritional support.

LC3 (autophagy-related gene 8 (Atg-8)) and Beclin 1 expression and autophagosome formation have been observed in Intrauterine Growth Retardation (IUGR) patients, and it has been reported that the IUGR-causing abnormal placentation is associated with cell homeostasis imbalance (Hung et al. 2012; Gong and Kim 2014).

In placentas with fetal growth restriction, Beclin 1, Atg family and LC3 expression are all determinant and autophagy is increased in these individuals compared to normal placentas (Wirawan et al. 2012). Autophagy was found to be increased in placentas with IUGR compared to normal placentas. The presence of placental dysfunction

and abnormal fetal development in the same study suggests that autophagy might be crucial in gynecological diseases. Although the mechanisms of autophagy during cellular proliferation and development are known, the role of autophagy in the placenta has not been fully elucidated. A study suggested that urotensin II (UT II) and LC3 release from the placenta increases in hypoxic conditions and that this situation stimulates placental autophagy (Gong and Kim 2014; Pan et al. 2018). In another study, UT II was found to be positively correlated with autophagy in the placenta (Pan et al. 2018).

Chifenti et al. (2013) reported in their study that autophagy is effective in the regulation of placental function, continuity of pregnancy, and utero-placental circulation. In this study, the distribution of LC3 and Beclin 1 autophagic markers supports the importance and existence of autophagy in pregnancy starting from the first trimester (Chifenti et al. 2013). Oh et al. (2008), according to their study on pathologies such as preeclampsia, the amount of LC3 and Beclin-1 in the first trimester of preeclamptic pregnancy was determined to be higher than in the first trimester of normal pregnancy.

Alleire et al. (2019) stated in a study that apoptosis and autophagy work with synergistic metabolism, that these two molecular systems are effective in homeostasis in the placenta, that ULK1, Beclin-1, LC3, Parkin and PINK1 are included in these mechanisms, and that their amounts may change during pregnancy supports the results.

In conclusion, our study revealed an immunohistochemical increase in LC3 and Beclin 1 density in the uterus, particularly in the endometrial areas.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported as 2209-A TUBITAK student project, with a project number 1919B012205744.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: DU, SU
 Supervision / Consultancy: SU
 Data Collection and / or Processing: DU, SU
 Analysis and / or Interpretation: DU, SU
 Writing the Article: DU, SU
 Critical Review: SU

REFERENCES

- Aita VM, Liang XH, Murty VVVS et al. (1999). Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics*, 59 (1), 59- 65.
- Al Rawi S, Louvet-Vallee S, Djeddi A, et al. (2011). Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*, 334 (6059), 1144-1147
- Allaire M, Rautou PE, Codogno P, Lotersztajn S (2019). Autophagy in liver diseases: Time for translation? *J Hepatol*, 70 (5), 985-998
- Arslan DÖ, Korkmaz G, Gözüağık D (2011). Otofaji: Bir hücresel stres yanıtı ve ölüm mekanizması. *AÜHSJ*, 4, 184-194.
- Chen S, Rehman SK, Zhang W et al. (2010). Autophagy is a therapeutic target in anticancer drug resistance. *BBA -Reviews on Cancer*, 1806 (2), 220-229.
- Chifenti B, Locci MT, Lazzeri G et al. (2013). Autophagy-related protein LC3 and Beclin-1 in the first trimester of pregnancy. *Clin Exp Reprod Med*, 40 (1), 33-37.
- Curtis S, Jones CJ, Garrod A, Hulme CH, Heazell AE (2013). Identification of autophagic vacuoles and regulators of autophagy in villous

- trophoblast from normal term pregnancies and in fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 26, 339-46.
- Deretic V, Singh S, Master S et al. (2006).** Mycobacterium tuberculosis inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defence mechanism. *Cell Microbiol*, 8, 719-727
- Di Bartolomeo S, Nazio F, Cecconi F (2010).** The role of autophagy during development in higher eukaryotes. *Traffic*, 11 (10), 1280-1289.
- Eskelinen EL (2005).** Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. *Autophagy*, 1, 1-10.
- Fisher SJ (2015).** Why is placental abnormal in preeclampsia? *Am J Obstet Gynecol*, 213 (4 Suppl), 115-122.
- Gong JS, Kim GJ (2014).** The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *Clin Exp Reprod Med*, 41 (3), 97-107.
- Hung TH, Chen SF, Lo LM et al. (2012).** Increased autophagy in placentas of intrauterine growthrestricted pregnancies. *PLoS One*, 7 (7), e40957.
- Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM et al. (2002).** mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110 (2), 163-175.
- Mooren FC, Krüger K (2015).** Exercise, autophagy, and apoptosis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, C. Bouchard (Ed.). 407-422
- Mortensen M, Ferguson DJ, Simon AK (2010).** Mitochondrial clearance by autophagy in developing erythrocytes: clearly important, but just how much so? *Cell Cycle*, 9, 1901-1906
- Munz C (2006).** Autophagy and antigen presentation. *Cell Microbiol*, 8, 891-898.
- Oh SY, Choi SJ, Kim KH et al. (2008).** Autophagy-related proteins, LC3 and Beclin-1, in placentas from pregnancies complicated by preeclampsia. *Reprod Sci*, 15, 912-920.
- Ozpolat B, Benbrook DM (2015).** Targeting autophagy in cancer management-stragies and development. *Cancer Manag Res*, 7, 291-299
- Pan YJ, He L, Zhou SJ et al. (2018).** Expression of urotensin II is associated with placental autophagy in patients with severe preeclampsia. *J Hum Hypertens*, 32 (11), 759-769.
- Rubinsztein DC, Difiglia M, Heintz N et al. (2005).** Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair *Autophagy*, 1, 11-22.
- Sato M, Sato K (2011).** Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*, 334, 1141-1144.
- Song WH, Yi YJ, Sutovsky M, Meyers S, Sutovsky P (2016).** Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc Natl Acad Sci*, 113 (36), e526-570.
- Stitzel ML, Seydoux G (2007).** Regulation of the oocyte-to-zygote transition. *Sci*, 316 (5823), 407-408.
- Tatar M, Tufekci KK, Uslu S, Öner J (2023).** Expression of ADAMTS 1-4-8 and placental growth factor in ovary and oviduct during pregnancy in the first trimester. *Anat Histol Embryol*, 52 (4), 619-626.
- Xie Z, Klionsky DJ (2007).** Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*, 9 (10), 1102.
- Wileman T (2006).** Aggresomes and autophagy generate sites for virus replication. *Sci*, 312, 875-878.
- Wirawan E, Lippens S, Vanden Berghe T et al. (2012).** Beclin1: a role in membrane dynamics and beyond. *Autophagy*, 8, 6-17.
- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH (2005).** Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin*, 26 (12), 1421-1434.
- Yang P, Li ZQ, Tye KD et al. (2020).** Effects of an orally supplemented probiotic on the autophagy protein LC3 and Beclin1 in placentas undergoing spontaneous delivery during normal pregnancy. *BMC Pregnancy Childbirth*, 20, 216.
- Yoshida GJ (2017).** Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment. *J Hematol Oncol*, 10, 67.



Slaughter and Carcass Traits of Gray Hungarian and German Mast Geese

Turgut KIRMIZIBAYRAK¹  Selda KARADAĞ² *  Buket BOĞA KURU¹ 

¹Kafkas University, Department of Animal Breeding and Husbandry, Faculty of Veterinary Medicine, 36000, Kars, Türkiye

²Kafkas University, Department of Health Sciences Institute, 36000, Kars, Türkiye

Received: 04.11.2023

Accepted: 15.01.2024

ABSTRACT

This study was carried out to determine the slaughter and carcass traits of Gray Hungarian and German Mast geese raised in private farm conditions in Kars province, and the effect of genotype and sex on these traits. A total of 113 geese, 71 females (51 Gray Hungarian geese and 20 German Mast geese) and 42 males (28 Gray Hungarian geese and 14 German Mast geese) were slaughtered at approximately 6 months of age. The mean live weights of Gray Hungarian and German Mast geese before slaughter were 4291.96 and 3007.59 g, respectively. Statistically significant differences were found between Gray Hungarian and German Mast geese in slaughter and carcass traits except gizzard weight ($p < 0.001$). No statistically significant difference was detected between the two genotypes in terms of hot carcass weight, blood ratio, and feather ratio ($p > 0.050$). There was a statistically significant difference in gizzard weight between the sex groups of Gray Hungarian geese ($p < 0.001$). A statistically significant difference was found only in hot carcass yield among all traits examined between the sex groups of German Mast geese ($p < 0.001$). In conclusion, it was determined that Gray Hungarian geese reared in commercial enterprise breeding conditions in Kars province were generally superior to Mast geese in terms of slaughter and carcass traits. Apart from local goose breeds, it may be suggested that breeders may prefer Gray Hungarian geese compared to German Mast geese to obtain heavy carcasses at an earlier age.

Keywords: Carcass traits, Genotype, Goose, Sex, Slaughter weight.

ÖZ

Gri Macar ve Alman Mast Kazlarının Kesim ve Karkas Özellikleri

Bu çalışma, Kars ilinde özel bir işletme koşullarında yetiştirilen Gri Macar ve Alman Mast kazlarının kesim ve karkas özellikleri ile bu özellikler üzerine genotip ve cinsiyetin etkisini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Araştırmada bu amaçla yaklaşık 6 aylık yaşta 71'i dişi (51 Gri Macar kazı, 20 Alman Mast kazı) ve 42'si erkek (28 Gri Macar kazı, 14 Alman Mast kazı) olmak üzere toplam 113 kaz kesilmiştir. Elde edilen bulgulara göre Gri Macar ve Alman Mast kazlarında kesim öncesi canlı ağırlık ortalamaları sırasıyla 4291.96 ve 3007.59 g olarak belirlenmiştir. Gri Macar ve Alman Mast kazları arasında taşlık ağırlığı hariç incelenen kesim ve karkas özellikleri bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar bulunmuştur ($p < 0.001$). İki genotip arasında sıcak karkas randımanı, kan oranı ve tüy oranı bakımından ise istatistiksel olarak önemli bir farklılık ($p > 0.050$) tespit edilmemiştir. Gri Macar kazları cinsiyet grupları arasında taşlık ağırlığı bakımından istatistiksel olarak önemli bir farklılık olduğu saptanmıştır ($p < 0.001$). Alman Mast kazı cinsiyet gruplarında incelenen tüm özellikler içinde sadece sıcak karkas randımanı bakımından istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur ($p < 0.001$). Sonuç olarak, Kars ilinde özel bir işletme koşullarında yetiştiriciliği yapılan Gri Macar kazlarının genel olarak kesim karkas özellikleri bakımından Mast kazlarına göre daha üstün olduğu belirlenmiştir. Yerli kaz ırklarına alternatif olarak daha erken yaşta ağır karkas elde etmek isteyen yetiştiricilere Alman Mast kazlarına göre Gri Macar kazı yetiştiriciliği yapmaları önerilebileceği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cinsiyet, Genotip, Karkas özellikleri, Kaz, Kesim ağırlığı.

INTRODUCTION

Among poultry species, chicken farming is the main source of commercial poultry meat production worldwide; however, production of goose meat plays an important role

as an alternate food of animal origin. Today, many different genotypes of geese are bred. Although the production share of goose meat is lower than chicken, it increases consumer demand due to the differences in the taste and composition of the meat (Gumułka and Połtowicz



2020; Razmaité 2022). In addition to meat, goose breeding has a high commercial potential due to its products such as fat, feather and fatty liver. Geographical and cultural differences have led to significant commercial earnings from geese breeding in some countries and regions. In Türkiye, despite some regional, geographical, and cultural advantages, commercial goose breeding is extremely limited (Guemene et al. 2012; Kırmızıbayrak 2018).

The geese population density in Türkiye differs significantly due to geography. In Türkiye, goose breeding is most intensively practiced in Kars and Ardahan provinces in Northeastern Anatolia and Muş province in Eastern Anatolia Region. Although depends on year, approximately 35% of Türkiye's geese population is found in Kars province (TÜİK 2021). The fact that goose breeding is the most common poultry farming in Kars and surrounding regions is associated with the high habit of consumption of geese meat, the traditional extensive breeding conditions by the local community, and the low cost of meat production. The goose meat obtained primarily contributes to the nutrition of the people of the region, thus supporting the regional and national economy (Kırmızıbayrak and Önk 2011; Saatçı et al. 2021).

Goose farms in Kars and its surroundings generally include local genotypes. Although low-capacity family farms traditionally use natural incubation method, the number of goose farms and the population of geese in Kars province have increased in recent years (TÜİK 2021). The rapid increase in the demand for goose carcasses in the region has increased the importance given to goose breeding, and breeders have begun searching for alternative sources of outside the region in order to increase goose meat production. For this purpose, live goose or their carcasses are brought to the region from other provinces such as Şanlıurfa, Diyarbakır, Muş, Yozgat, and Aksaray. In addition, some breeders have started to breed foreign genotype geese in order to obtain higher egg and meat yields. Due to this demand, foreign genotype geese such as Chinese, Hungarian, Linda, and Mast have been brought to Kars in recent years. Some small-scale breeders have improperly and randomly crossbred the local and foreign goose genotypes (Boz et al. 2020; Kırmızıbayrak 2020).

The studies on geese in Türkiye are generally conducted with indigenous genotypes, and there is a limited number of studies focusing on foreign goose genotypes. It is crucial to examine the yield traits of geese with foreign genotypes under breeding conditions similar to those for local breeds. This study aimed to investigate the slaughter and carcass traits of Gray Hungarian and German Mast breeds raised in Kars, and the effect of genotype and sex on these characteristics.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out after obtaining approval from the Kafkas University's Ethics Committee for Animal Experiments (KAÜ-HADYEK). (Decision Number: KAÜ-HADYEK/2023-023).

The animal material in the study consisted of 113 Gray Hungarian and German Mast geese (71 females and 42 males), which were raised under private enterprise conditions in the center of Kars province in Türkiye and were approximately 6 months old at the time of slaughter. The goose eggs were hatched in May. Following hatching, chicks were placed in growing cages and the temperature inside the cages was set at 30 ± 2 °C until 7 days of age. A stove was used for heating. The temperature inside the

poultryhouse was reduced to 25 ± 2 °C when the goslings were 7 days old. Goslings were fed growth feed until two weeks of age (Table 1). The goslings, which were removed from the cages to the ground at the end of three weeks of age, were fed with approximately 250-300 g feed per animal during this period and the heating process inside the poultryhouse was terminated. In addition, crushed barley was given in addition to concentrate feed. In the following weeks (week 4-6), the amount of feed given to the goslings was increased, and 300-350 g feed was given per goose.

Table 1: Nutrient contents of the growth feed used in the study, %.

CP	22.0
CS	4.0
RO	3.2
CA	5.4
ME (Kcal/kg)	3000
Ca	0.9
Na	0.2
P	0.7
Lys	1.3
M	0.9

(CP: Crude protein, CC: Crude cellulose, RO: Raw oil CA: Crude ash, ME: Metabolic energy, Ca: Calcium, Na: Sodium, P: Phosphorus, Lys: Lysine, M: Methionine).

The farm management terminated the use of concentrate feed from 6 weeks of age in order to reduce feed costs, and the geese were fed only 400-450 g of crushed barley. Geese grazed from 8 weeks of age until slaughter and the same amount of barley was given to the geese after grazing. One month before slaughter, the movement area of the geese was restricted and they grazed close to their shelters, and 400-450 g of barley was given per goose. The geese were slaughtered at the end of October. The geese were starved for 12 hours before slaughter and only water was given during this period. On the day of slaughter, the geese were numbered and their live weights were determined. Blood, head, wing, and foot weights were determined after slaughter. The birds were plucked by a plucking machine and the feather weight was calculated. After the abdomen was opened, the sex of the birds was confirmed by observing the presence of testes or ovaries. Hot carcass, heart, liver, gizzard, and intestine weights of each carcass were determined. Since the farm sold the carcasses with the abdominal fat, the abdominal fat remained on the carcass and could not be weighed separately. Different parts of the carcasses were weighed using a digital scale with a sensitivity of 0.01 g.

Statistical Analysis

Statistical analysis of the data was performed using the software SPSS version 26. Normality of the data was checked with the shapiro-wilk test. The t-test was used to determine the statistical significance of the differences between the means of the slaughter and carcass traits, genotype groups, and sex groups.

RESULTS

The means and standard error values of slaughter and carcass traits of geese with different genotypes and sexes in this study and the statistical significance of the differences between group means are given in Table 2 and Table 3. There were statistically significant differences

between Gray Hungarian and German Mast geese in slaughter and carcass characteristics except gizzard weight ($p < 0.001$). The pre-slaughter live weight means of Gray Hungarian and German Mast geese were 4291.96 and

3007.59 g, respectively, and statistically significant differences were found between the genotype group means and between the sex groups of the two genotypes ($p < 0.001$).

Table 2: Mean (\bar{x}) and standard error ($S\bar{x}$) values of slaughter and carcass traits.

Slaughter traits (g)	Genotype	Gender			General $\bar{x} \pm S\bar{x}$
		Male $\bar{x} \pm S\bar{x}$	Female $\bar{x} \pm S\bar{x}$	p	
Live weight	GHG	4411.39±192.57	4226.39±76.97	0.378	4291.96±84.27
	GMG	3162.50±182.66	2899.15±111.95	0.203	3007.59±100.83
	p	0.001	0.001	-	0.001
Hot carcass weight	GHG	2897.61±135.27	2816.00±59.21	0.584	2844.92±60.95
	GMG	2241.21±108.49	1880.00±73.00	0.007	1994.88±73.36
	p	0.003	0.001	-	0.001
Blood weight	GHG	235.32±13.11	208.53±9.34	0.096	218.03±7.70
	GMG	170.79±13.58	141.50±13.02	0.139	153.56±9.68
	p	0.004	0.001	-	0.001
Feather weight	GHG	306.93±15.85	287.86±8.92	0.300	294.62±8.05
	GMG	235.21±20.44	200.95±14.73	0.172	215.06±12.24
	p	0.010	0.001	-	0.001
Head weight	GHG	159.71±4.31	151.39±2.45	0.074	154.34±2.23
	GMG	130.57±3.72	126.70±4.56	0.542	128.29±3.06
	p	0.001	0.001	-	0.001
Feet weight	GHG	104.96±6.61	101.25±2.23	0.598	102.57±2.73
	GMG	82.79±5.45	79.50±5.04	0.667	80.85±3.68
	p	0.013	0.001	-	0.001
Heart weight	GHG	33.54±1.33	32.04±0.78	0.304	32.57±0.69
	GMG	28.07±1.40	26.20±0.68	0.197	26.97±0.71
	p	0.014	0.001	-	0.001
Liver weight	GHG	79.32±3.87	73.25±1.73	0.160	75.41±1.78
	GMG	70.43±1.89	68.75±2.20	0.589	69.44±1.50
	p	0.046	0.150	-	0.012
Gizzard weight	GHG	141.50±4.26	130.84±2.65	0.028	134.62±2.34
	GMG	138.21±7.03	127.45±4.21	0.173	131.88±3.86
	p	0.676	0.498	-	0.532
Intestine weight	GHG	262.29±10.10	255.94±5.09	0.578	258.19±4.84
	GMG	218.50±17.36	206.45±10.21	0.529	211.41±9.23
	p	0.025	0.001	-	0.001

(p: statistical significance value, \bar{x} : arithmetic mean, $S\bar{x}$: standard error value, GHG: Gray Hungarian Geese, GMG: German Mast Geese)

Hot carcass weight means were 2897.61 and 2241.21 g for males and 2816.00 and 1880.00 g for females of Gray Hungarian and German Mast goose, respectively, and statistically significant differences were found between the same sex groups of both genotypes ($p < 0.001$). Although there was no statistical difference between the sex groups of the Gray Hungarian genotype ($p > 0.05$), it was found that the hot carcass weight means of the German Mast goose males was higher ($p < 0.001$) than the females. The overall means of hot carcass weight were 2844.92 g and 1994.88 g in Gray Hungarian and German Mast geese, respectively, and the difference between the group means was statistically significant ($p < 0.001$). Evaluation of the same sexes between the two genotypes revealed that the

examined traits were superior in male geese and were found to be consistent with the results of other studies (Mazanowski et al. 2005; Saatçı et al. 2009; Kırmızıbayrak and Önk 2011), in which genotype and sex had an effect on carcass weight.

Goose feather has high economic value. In addition to the direct sale of goose feather, breeders use it to make quilts, pillows, and mattresses. In this study, the mean feather weight was 294.62 g of the Gray Hungarian geese and 215.06 g of the German Mast geese, and there was a significant difference between the averages, and also the feather weight of Gray Hungarian male and female geese was higher than German Mast geese ($p < 0.001$).

Table 3: Ratios (\bar{x}) and standard error ($S\bar{x}$) values of slaughter and carcass traits examined in geese.

Carcass parts (%)	Genotype	Gender			General $\bar{x}\pm S\bar{x}$
		Male $\bar{x}\pm S\bar{x}$	Female $\bar{x}\pm S\bar{x}$	p	
Hot carcass yield	GHG	65.63±0.75	66.62±0.65	0.343	66.27±0.50
	GMG	72.05±2.91	65.16±1.40	0.026	67.99±1.55
	p	0.050	0.286	-	0.295
Blood rate	GHG	5.42±0.27	4.91±0.20	0.128	5.09±0.16
	GMG	5.62±0.51	4.85±0.35	0.211	5.17±0.30
	p	0.712	0.883	-	0.808
Feather rate	GHG	6.99±0.23	6.87±0.22	0.717	6.91±0.16
	GMG	7.61±0.83	6.96±0.48	0.477	7.23±0.44
	p	0.365	0.862	-	0.507
Head rate	GHG	3.77±0.17	3.62±0.07	0.425	3.68±0.08
	GMG	4.34±0.30	4.47±0.20	0.729	4.42±0.17
	p	0.080	0.001	-	0.001
Feet rate	GHG	2.42±0.14	2.41±0.05	0.941	2.42±0.06
	GMG	2.86±0.37	2.80±0.19	0.880	2.82±0.19
	p	0.294	0.057	-	0.043
Heart rate	GHG	0.78±0.03	0.76±0.02	0.615	0.77±0.01
	GMG	0.92±0.07	0.92±0.03	0.983	0.92±0.03
	p	0.060	0.001	-	0.001
Liver rate	GHG	1.85±0.09	1.76±0.06	0.414	1.79±0.05
	GMG	2.32±0.14	2.42±0.10	0.570	2.38±0.08
	p	0.005	0.001	-	0.001
Gizzard rate	GHG	3.41±0.21	3.15±0.09	0.245	3.24±0.09
	GMG	4.45±0.20	4.50±0.20	0.871	4.48±0.14
	p	0.001	0.001	-	0.001
Intestine rate	GHG	6.11±0.24	6.11±0.12	0.991	6.11±0.11
	GMG	7.11±0.64	7.19±0.33	0.904	7.16±0.32
	p	0.158	0.005	-	0.004

(p: statistical significance value, \bar{x} : arithmetic mean, $S\bar{x}$: standard error value, GHG: Gray Hungarian Geese, GMG: German Mast Geese)

The mean values of blood, head, feet, heart, liver, and intestine weight are given in Table 2. There was a statistically significant difference between the same sex groups of the two genotypes in terms of these traits ($p<0.001$). The overall mean of gizzard weight in Gray Hungarian and German Mast geese were determined as 134.62 and 131.88 g, respectively, and there was no statistically significant difference between the genotype groups for the same sex ($p>0.050$), whereas a statistically significant difference was found between males and females in favor of males in Gray Hungarian geese ($p<0.001$).

Proportional (%) mean values and standard error values of slaughter carcass traits in this study are given in Table 3. Hot carcass dressing percentage values were 66.27% and 67.99% in Gray Hungarian and German Mast geese, respectively. In literature, carcass dressing percentage in geese generally varies between 60-73% and increases with age (Tilki et al. 2004; Kırmızıbayrak and Önk 2011; Akbaş et al. 2020; Boz and Sarıca 2021). The carcass yield of approximately 67-68% obtained in the present study is considered to be at an acceptable level considering the nutritional conditions and age. There was no statistically

significant difference ($p>0.050$) between the two genotypes in blood and feather ratio. Statistically significant differences ($p<0.001$) were found among the other traits analyzed.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Pre-slaughter live body weight means of the goose genotypes examined in this study were compared with other study findings. The values of the present study were lower than those reported by Boz and Sarıca (2021) for Turkish indigenous geese in Yozgat province, Tilki et al. (2004) for 8 months old Turkish indigenous geese, Kırmızıbayrak (2002) for 6-7 months old Turkish indigenous geese, Uhlřfováet al. (2018) about 2 and 4 months old Eskildsen Schwer and Czech geese, Lewko et al. (2022) on commercial hybrids of White Kołuda (W-31) and Pomeranian and Kielecka geese, Biesiada-Drzazga (2014) for in W11, W33 and W31 White Koluda geese, Tilki et al. (2009) and Güner et al. (2004). Pre-slaughter body weight value for male geese reported by Şahin et al. (2008) was similar to the value reported for Gray Hungarian geese in the present study. The value reported for female geese was higher than the pre-slaughter body

weight of German Mast geese in this study. A study by Akbaş et al. (2020) reported similar values for Linda geese as in the present study for German Mast geese, but lower than those reported for Gray Hungarian geese. Yakan et al. (2012) investigated geese slaughtered at the age of 8-9 months and the reported values were for Gray Hungarian geese and higher for German Mast geese in this study. The values reported by Boz (2019) were close to our results. It can be concluded that the finding values of this study were lower than the literature reports on local geese genotypes in the region. This situation can be explained by the fact that the geese slaughtered in other studies were generally at the age of 8-10 months, while the foreign genotype geese in this study were slaughtered at earlier age of approximately 6 months following the short fattening period, and the nutritional conditions of the geese in the enterprise were below the mark.

In the present study, hot carcass weight was higher in male geese for both genotypes. The mean weight of hot carcass obtained in this study was lower than those of Tilki et al. (2004) and Çelik and Bozkurt (2009). The mean weight of hot carcass determined for Gray Hungarian geese in this study was similar to those reported by Kırmızıbayrak and Önk (2011), Yakan et al. (2012), and Boz and Sarıca (2021); whereas lower for German Mast geese compared to other studies.

The overall mean of feather weight determined as 294.62 g in Gray Hungarian geese and 215.06 g in German Mast geese were lower than those of native breeds reported by Tilki and İnal (2004), similar to those of reported by Boz (2019), and higher than those of reported by Kırmızıbayrak and Önk (2011). The mean blood weight in Gray Hungarian and German Mast geese was lower than the values in the study of Akbaş et al. (2020), Kırmızıbayrak and Önk (2011), and Boz (2019), and similar to the values reported by Tilki et al. (2004), Saatçı et al. (2009), and Kırmızıbayrak and Kuru (2018). It is suggested that these differences may be due to possible differences in genotype, age, or duration of bleeding. The mean weight of head and foot for German Mast geese was similar to those determined by Kırmızıbayrak and Kuru (2018) and higher for Gray Hungarian geese. The mean values for head and foot weights in this study were similar to those reported by Boz (2019) and Kırmızıbayrak and Önk (2011), but higher than the mean values reported by Boz and Sarıca (2021).

We found the mean weight of liver and gizzard among edible organs to be lower than those reported by Boz and Sarıca (2021) for geese in Yozgat province; heart weight on the other hand was similar. The heart and gizzard weights reported by Tilki et al. (2009) for domestic geese were similar to the findings of this study, while liver weight was higher than our findings. The mean heart and liver weights obtained in this study were similar to those reported by Yakan et al. (2012) and Tilki et al. (2004). The mean gizzard weight in this study was lower than the values reported by Akbaş et al. (2020) and Tilki et al. (2004), while higher than the values reported by Kırmızıbayrak and Önk (2011), and similar to the values reported by Sarıca et al. (2015).

In conclusion, the traits of Gray Hungarian goose and German Mast goose, which are preferred by breeders in Kars province as an alternative to indigenous Turkish breeds in goose meat production in Türkiye, were compared under commercial enterprise conditions, and it was concluded that Gray Hungarian goose was superior to German Mast goose. It was also demonstrated that the

Gray Hungarian geese can reach the appropriate carcass weight in a much shorter feeding period. In order to reveal the better traits of foreign goose genotypes as an alternative to local indigenous genotypes, comparing their performance with these genotypes under the same conditions will provide more accurate information. The results obtained in this study were significant as the study was carried out under commercial enterprise conditions in Kars province, where at least $\frac{1}{3}$ of Türkiye's goose population is raised and has a significant share in the Turkish goose meat market.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: SK

Supervision / Consultancy: TK

Data Collection and / or Processing: SK

Analysis and / or Interpretation: BBK

Writing the Article: TK, BBK, SK

Critical Review: TK, BBK, SK

REFERENCES

- Akbaş AA, Sari M, Buğdaycı KE, Saatçı M (2020). The effect of sex and slaughter age on growth slaughter and carcass characteristics in Lindovskaya geese reared under breeder conditions. *Turk J Vet Anim Sci*, 44 (5), 1087-1092.
- Biesiada-Drzazga B (2014). Growth and slaughter value of W₁₁, W₃₃ and W₅₁ White Kolumbia geese. *Europ Poult Sci*, 78.
- Boz MA, Sarıca M, Yamak US (2020). Türkiye'de kaz yetiştiriciliğine olan talep ve gelecek değerlendirilmesi. 3. Türkiye Kaz Yetiştiriciliği Çalıştayı ve Kaz Günü Etkinliği Sonuç Raporu, 17-18 Şubat, Kars.
- Boz MA, Sarıca M (2021). Growth Performance. Slaughter and Carcass Traits in White and Multicolour Native Geese. *JAPOB*, 2 (1), 17-22.
- Boz MA (2019). Effect of classified rearing according to live weight on growth, carcass and some meat quality characteristics in geese. *Turk J Food Agric Sci*, 7 (9), 1429-1434.
- Çelik B, Bozkurt Z (2009). Slaughter and carcass traits of native geese reared in Muş province. *Lucr Ştiinţ Zooteh biotehnoł*, 42 (2), 423-428.
- Guemene D, Shi ZD, Guy G (2012). Production systems for waterfowl. Eds: Sandilands V, Hocking P. M, *Alternative systems for poul*, 128-154.
- Gumułka M, Połtowicz K (2020). Comparison of carcass traits and meat quality of intensively reared geese from a Polish genetic resource flock to those of commercial hybrids. *Poult Sci*, 99 (2), 839-847.
- Güner A, Doğruer Y, Uçar G, Gürbüz Ü (2004). Yerli kazların (Anser domesticus) karkas kompozisyonu ve et randımanı özelliklerinin incelenmesi. *Vet Bil Derg*, 20 (3), 35-42.
- Kırmızıbayrak T (2018). Türkiye'de Kaz Yetiştiriciliğinin Ticari Bir Sektör Olmasının Önündeki Engeller. Türkiye Kaz Yetiştiriciliği Çalıştayı Sonuç Raporu, 22-23 Şubat, Yozgat.
- Kırmızıbayrak T, Önk K (2011). Effects of age and sex on slaughtering and carcass characteristics of Turkish native geese reared in free range production conditions in Kars province. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17 (1), 41-45.
- Kırmızıbayrak T (2002). Kars ilinde halk elinde yetiştirilen yerli ırk kazların kesim ve karkas özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 26, 667-670.
- Kırmızıbayrak T (2020). Türkiye kazcılığı: Kars ve Ardahan illeri. 3. Türkiye Kaz Yetiştiriciliği Çalıştayı ve Kaz Günü Etkinliği Sonuç Raporu, 17-18 Şubat, Kars.
- Kırmızıbayrak T, Kuru BB (2018). Slaughter and carcass traits of geese with different feather colour and gender. *Braz J Poult Sci*, 20, 759-764.
- Lewko L, Skotarczak E, Moliński K, Gornowicz E (2022). Analysis of slaughter traits in geese depending on breed, sex and length of rearing period. *Poult Sci*, e102281.
- Mazanowski A, Bernacki Z, Kisiel T (2005). Meat traits and meat chemical composition in hybrids of Graylag (Anser anser L.) with White Kolumbia and Slovakian geese. *Anim Sci Pap Rep*, 23 (1), 15-32.
- Razmaitė V (2022). Present conservation status and carcass and meat characteristics of Lithuanian Vištinės goose breed. *Animals*, 12 (2), 159.

- Saatci M, Sarı M, Tilki M, Yapıcıer Ö (2021).** Her Yönüyle Kaz Yetiştiriciliği. P: 24-25, II. Baskı, Kutlu Avcı Ofset Ltd. Şti. Antalya.
- Saatci M, Tilki M, Kaya I, Kırmızıbayrak T (2009).** Effects of fattening length, feather colour and sex on some traits in native Turkish geese. II. Carcass traits. *Arch Geflügelk*, 73, 61-66.
- Sarıca M, Boz MA, Yamak US (2015).** Yozgat ili halk elinde yetiştirilen beyaz ve alaca kazların kesim ve karkas özellikleri. *Turk J Food Agric Sci*, 3 (3), 142-147.
- Şahin T, Tilki M, Kaya İ, Ünal Y, Elmalı D (2008).** Effect of different protein levels for finishing period on fattening performance and carcass traits in native Turkish geese. *J Vet Anim Adv*, 7 (11), e13641369.
- Tilki M, İnal Ş (2004).** Türkiye’de yetiştirilen değişik orjinli kazların verim özellikleri. III. kesim ve karkas özellikleri. *Turk J Vet Anim Sci*, 28, 165-171.
- Tilki M, Saatci M, Kırmızıbayrak T, Aksoy AR (2004).** Kars ili Boğazköy’de yetiştirilen kazların kesim ve karkas özellikleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 10, 143-146.
- Tilki M, Şahin T, Sarı M, Işık S, Saatci M (2009).** Effect of age and sex on fattening performance and carcass characteristics of native Turkish geese. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 15 (2), 245-250.
- TÜİK (2021).** Türkiye İstatistik Kurumu [Http://www.TÜİK.Gov.Tr](http://www.tuik.gov.tr). Hayvansal Üretim İstatistikleri Erişim Tarihi: 25.11.2022.
- Uhlířová L, Tůmová E, Chodová Det al (2018).** The effect of age, genotype and sex on carcass traits, meat quality and sensory attributes of geese. *Asian-Australas J Anim Sci*, 31 (3), 421.
- Yakan A, Elmalı DA, Elmalı M et al (2012).** Carcass and meat quality characteristics of white and multicolor geese under local breeder conditions. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (4), 663-670.



Three-Dimensional Examination of Humerus and Antebrachium Bones in the Red hawk (*Buteo Rufinus*) with Computed tomography (CT)

Veysel DELİBAŞ^{1*} Zafer SOYGÜDER¹ Cemil GÖYA² Loğman ASLAN³ Gamze ÇAKMAK¹

¹Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, 65040, Van, Türkiye

²Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Medicine, Department of Radiodiagnostic, 65040, Van, Türkiye

³Van Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, 65040, Van, Türkiye

Received: 27.11.2023

Accepted: 15.01.2024

ABSTRACT

The red hawk (*Buteo Rufinus*) is a medium-sized bird of prey with wide wings, belonging to the order Falconiformes and a member of the Accipitridae family. The Red hawk is a wild bird species and is easily recognized by its black feathers and red color on its wing feathers. In poultry, the thoracic extremity is developed as a wing. Techniques such as radiography, computed tomography and magnetic resonance contribute significantly to the evaluation of biological data in endangered species and wildlife because they provide the best view of anatomical structures and organs, are non-invasive, and allow sensitive diagnoses. The aim of this study was to create 3D models of the humerus and antebrachium bones of the Red hawk, an important bird of prey, with multi-detector computer tomography and to examine the bones mentioned morphologically and morphometrically through the models obtained. Humerus and antebrachium bones of a total of 6 dead adult Red hawks, 3 females and 3 males, were used as materials. When the morphometric results were examined, the average humerus length, average ulna length and average radius length in Red hawks were expressed in mm for the left and right extremities, regardless of gender. Moreover morphometric measurements of the humerus, ulna and radius bones were compared statistically between the right and left wings, and it was concluded that there was a significant difference between some values with a value of $p < 0.05$.

Keywords: Computed tomography, Red hawk, Humerus, Radius, Ulna.

ÖZ

Kızıl Şahinde (*Buteo Rufinus*) Humerus ve Antebrachium Kemiklerinin Bilgisayarlı tomografi (BT) ile Üç Boyutlu Olarak İncelenmesi

Kızıl şahin (*Buteo Rufinus*) Falconiformes takımında yer alan ve Accipitridae familyasının bir üyesi olarak bulunan orta boylu geniş kanatlara sahip bir yırtıcı kuştur. Kızıl şahin yabani bir kanatlı türü olup kanat teleklerindeki siyah renkli tüyleri ve kızıl rengiyle kolayca tanınmaktadır. Kanatlılarda ön veya torakal ekstremitelerde kanat halinde gelişmiştir. Kanat (Ossa membri thoracici) ise sırasıyla scapula, clavicula, os coracoidea, humerus, antebrachium (ulna ve radius), carpus, metecarpus ve digiti'den meydana gelmektedir. Radyografi, bilgisayarlı tomografi ve manyetik rezonans gibi teknikler, anatomik yapıların ve organların en iyi görünümünü sağlamaları, invaziv olmamaları ve hassas teşhisler için uygun oldukları için nesli tükenmekte olan türlerin ve yaban hayatında biyolojik verilerin değerlendirilmesine önemli derecede katkı sağlamaktadır. Bu çalışma ile önemli bir yırtıcı kuş olan Kızıl şahinin humerus ve antebrachium kemiklerinin multi dedektörlü bilgisayarlı tomografi ile 3D modellerini oluşturmak, ayrıca elde edilen modeller aracılığı ile belirtilen kemiklerin morfolojik ve morfometrik olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Materyal olarak 3 adet dişi ve 3 adet erkek olmak üzere toplam 6 adet ölmüş erişkin Kızıl şahin'e ait humerus ve antebrachium kemikleri kullanıldı. Morfolojik olarak sonuçlar incelendiğinde, bilgisayarlı tomografi ile elde edilen 3 boyutlu görüntülerin anatomik yapıları net bir şekilde ortaya koyduğu sonucuna varılmıştır. Morfometrik sonuçlar incelendiğinde Kızıl şahinlerde ortalama humerus uzunluğu, ortalama ulna uzunluğu ve ortalama radius uzunluğu cinsiyet ayrımı yapmaksızın sol ve sağ ekstremitelerde için mm şeklinde belirtilmiştir. Ayrıca humerus, ulna ve radius kemiklerinin morfometrik ölçümleri sağ ve sol kanat arasında istatistiksel olarak karşılaştırılmış ve bazı değerler arasında $p < 0.05$ değeri ile anlamlı bir farklılık olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Bilgisayarlı tomografi, Humerus, Kızıl şahin, Radius, Ulna.



INTRODUCTION

A member of the order Falconiformes and a member of the family Accipitridae, the Red hawk, is a medium-sized bird of prey with broad wings (Orhan et al. 2002). The Red hawk is a wild bird species and is easily identified by its black feathers and red wing feathers. It can fly particularly fast is due to its morphologically well-developed wings (Demirsoy 1992). For this reason, it is the bird species with the best maneuverability among birds of prey. In addition, the main characteristics of Red hawks are the presence of a sharp, well-developed upper jaw, a hook-shaped beak that widens downwards, and very strong spurs (Demirsoy 1992).

In birds, the wing develops as a thoracic extremity. The wing is connected to the body by a belt consisting of three bones called ossa cinguli extremitatum thoracicarum (scapula, clavícula and os coracoideus) (Gültekin 1974; Dursun 2008). Ossa membri thoracici consists of scapula, clavícula, os coracoideus, humerus, antebrachium (ulna and radius), carpus, metecarpus and digiti, respectively. An important feature that distinguishes Red hawks from other bird species is their wide wingspan (Gültekin 1974; Dursun 2008). For this reason, a significant part of the stated wingspan consists of the long bones (humerus and antebrachium) that form the wing structure of this bird species.

Humerus: It is one of the long bones participating in the wing structure. Since it is a long bone, it has a body consist the trunk and two ends, proximal and distal (Gültekin 1974; Dursun 2008). **Antebrachium:** This bone, consisting of ulna and radius, is examined in three regions, just like the humerus. From these regions, the proximal end is positioned backwards, the distal end is positioned forward, and the bone body is positioned parallel to the humerus (Gültekin 1974; Dursun 2008).

Today, computer and 3D reconstruction technologies, widely used in the medical field, are also rapidly gaining ground in veterinary medicine. It is more useful than other anatomical methods because it clearly details the complex structure of the tissue to be imaged, especially through images obtained by multidetector computed tomography (MDCT) and magnetic resonance imaging (MRI), which are radiological imaging techniques. Considering the results of many studies, it can be said that radiological imaging techniques create versatile images of tissues and organs and that a three-dimensional model of any tissue can be created using these images (D'Urso et al. 1999; Verhoff et al. 2008; Demircioğlu et al. 2020).

In the literature review, it was determined that fractures in birds of prey mostly occur in the wings and less frequently in the foot and spinal skeleton (Kibar and Bumin 2006; Aslan et al. 2009). In line with the studies conducted in this context, it has been reported that 53% of the fractures in the wings occur in the humerus and 47% in the radius-ulna (antebrachium) bones (Kibar and Bumin 2006). Hence, many studies have been done on humerus and antebrachium in poultry; chicken, domestic duck, pigeon and quail (Yıldız et al. 1998), Turkey vulture (Novitskaya et al. 2017), Griffon vulture and Greater flamingo (Frongia et al. 2021), Japanese quail (Demiraslan et al. 2014), Kars goose (Doğan and Takçı 2021), Herring gull (*Larus argentatus*, Pontopidan), Rock pigeon (*Columba livia* Gmelin) and Willow ptarmigan (*Lagopus lagopus/linnaeus*) (Bonser 1995), Blue canary (Bhargavi et al. 2017), Commercial broiler and Desi chicken (Vistro et al. 2015).

Especially considering this situation, it is important to examine the humerus and antebrachium bones in birds of prey from an anatomical perspective using radiological imaging techniques. In this study, three-dimensional examination of humerus and antebrachium bones in the Red hawks (*Buteo Rufinus*) with computed tomography (CT) was studied to examine the specified bones morphologically and morphometrically through the models obtained.

MATERIAL AND METHODS

Animals

This study was carried out with the decision of Van Yuzuncu Yil University Animal Experiments Local Ethics Committee dated 30/06/2022 and numbered 2022/06-03. In the study, the humerus and antebrachium bones were used of a total of 6 dead adult Red hawks (3 females and 3 males) brought to Van Yuzuncu Yil University Wild Animals Protection and Rehabilitation Center at different times by The Nature Conservation and National Parks Van.

CT and 3D Modeling Process

The bones used in the study were scanned with a 256-slice computer tomography device (Philips Brilliance Ict). MDCT device with reference to Prokop (Prokop 2003) for computed tomography scanning; It was set as 80 kV, 200 MA, 639 mGY and cross-sectional thickness of 0.625 mm. The scanned images were saved as DICOM and transferred to the medical image processing program MIMICS 21.0 (The Materialize Group, Leuven, Belgium) for 3D modeling.

Process of Obtaining Morphometric Measurements from 3D Images

Nomina Anatomica Avium (Baumel and Club 1993) was taken as reference in morphological analyzes and in the use of all anatomical words within the scope of the study. Additionally, Von Den Driechsh (Von Den Driesch 1976) and Atalar et al. (Atalar et al. 2007) were used as references in determining morphometric measurement points. The obtained 3D models and the morphometric measurement points taken are given in Figures 1, 2 and 3.

Measurement parameters of humerus bone:

GL: Length of the humerus bone; SC: The smallest corpus width of the humerus bone; Bp: Proximal width of the humerus; Bd: Distal width of the humerus.

Measurement parameters of ulna bone:

UGL: Length of the ulna bone; USC: The smallest corpus width of the ulna bone; UBp: Proximal width of Ulna; UBd: Distal width of ulna.

Measurement parameters of radius bone:

RGL: Length of radius bone; RSC: The smallest corpus width of the radius bone; RBp: Proximal width of the radius; RBd: Distal width of radius.

Statistical Analysis

As descriptive statistics; average, standard deviation, minimum and maximum values are expressed. While the Mann-Whitney U test was used to compare whether there were differences between genders for these characteristics, the Wilcoxon test was used to compare the Right-Left differences. In the calculations, the statistical significance level was taken as 5% and the SPSS (21.0 ver.) statistical package program was used.

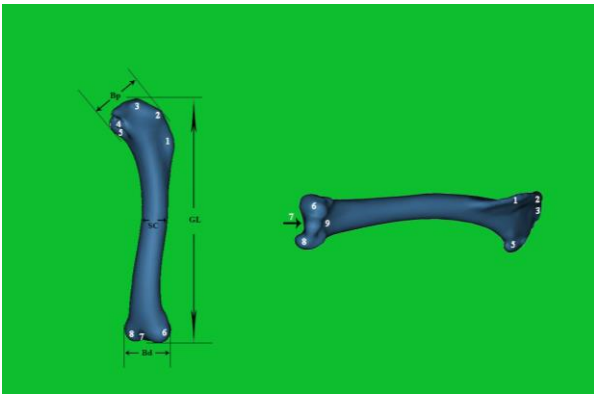


Figure 1: Anatomical points of the humerus; 1: crista deltopectoralis, 2: tuberculum dorsale, 3: caput humeri, 4: foramen pneumotricipitalis, 5: tuberculum ventrale, 6 condylus dorsale, 7: fossa olecrani, 8: condylus ventralis. Morphometric measurements of the humerus; GL: Length of the humerus bone, SC: The smallest corpus width of the humerus bone, Bp: Proximal width of the humerus, Bd: Distal width of the humerus.

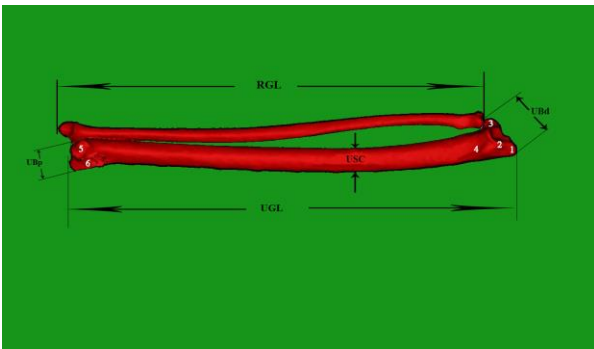


Figure 2: Anatomical points of the ulna; 1: olecranon, 2: crista intercotylaris, 3: cotyla dorsalia, 4: impressio brachialis, 5: incisura tuberculum carpale, 6: sulcus intercondylaris. Morphometric measurements of the ulna; UGL: Length of the ulna bone, USC: The smallest corpus width of the ulna bone, UBp: Proximal width of ulna, UBd: Distal width of ulna.

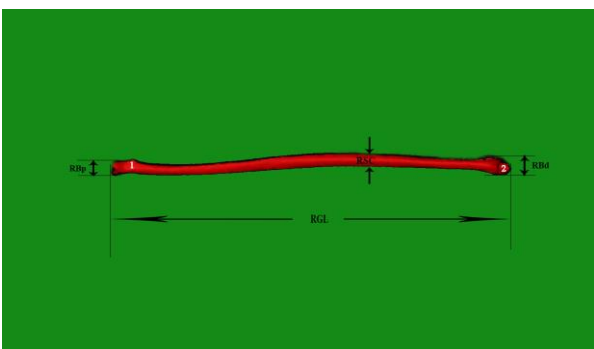


Figure 3: Anatomical points of radius; 1: tuber bicipitalis radialis, 2: sulcus tendinosa. Morphometric measurements of radius; RGL: Length of radius bone, RSC: The smallest corpus width of the radius bone, RBp: Proximal width of the radius. RBd: Distal width of radius.

RESULTS

Morphological Findings: When the 3D model of the humerus bone was examined morphologically, it was determined that all anatomical formations on the bone could be clearly seen. In this context, when the cranial surface of the humerus was examined, the caput humeri was clearly seen first in the proximal end. The presence of tuberculum dorsale was detected just above this anatomical structure, and tuberculum ventrale was detected below it. In addition, the crista deltopectoralis, which extends along the dorsal edge of the body of the humerus, is one of the important structures seen. When the caudal face is examined; In addition to the structures on the cranial face, there is the foramen pneumotricipitalis, which is very clearly visible. The tuberculum ventrale was clearly seen just lateral to the before mentioned hole. Due to straight the body of the humerus, it does not show any anatomical features.

Similarly, when the extremitas distalis of the humerus is examined, condylus dorsalis and ventralis are clearly seen on the cranial face. Additionally, there is fossa olacrani between the two condyles mentioned on this face. When the caudal face is examined, the presence of a shallow depression (fossa musculus brachialis) that allows the radius to articulate is seen.

Antebrachium: It consists of two bones (radius and ulna) parallel to the humerus, with the proximal end facing backward and the distal end facing forward. It was observed that it was located lateral to the ulna bone and had a body approximately twice as thick as the radius. The radius and ulna bones are tightly connected to each other, creating a wide spatium between them. When the proximal part of the ulna is examined; olecranon, crista intercotylaris, cotyla dorsalia and impressio brachialis were clearly seen. Distal to the ulna are the incisura tuberculum carpae and sulcus interconylaris, which serve to articulate with the carpal bones.

The radius articulates proximally with the humerus and ulna. In this region, the tuber bicipitalis radialis protrusion can be seen just below the caput radiale. The distal part of the radius is tightly connected with the ulna, which is located in the proximal part. On the lateral side of the distal region there is a groove called the sulcus tendinosa.

Morphometric Findings: According to morphometric results of the humerus, the average left and right humerus lengths (GL) in Red hawks that don't have gender identification were 125.11 mm and 126.17 mm, respectively, and the smallest corpus widths of the left and right humerus were 9.83 mm and 10.07 mm.

In addition, it was concluded that the proximal extremities width of the humerus of the left and right was 28.51 mm and 29.34 mm, respectively, and the distal extremities width of the humerus of the left and right was 21.61 mm and 20.99 mm, respectively (Table 1). When all left and right humerus morphometric measurement results were compared between male and female genders, it was determined that there was no difference in terms of gender with a $p > 0.05$ value (Table 1).

In the morphometric examination of the ulna, it was observed that the left and right average GL values were 140.01 mm and 139.89 mm, respectively, and the SC value was 8.12 mm and 7.15 mm. In addition to these measurements, it was concluded that the Bp values of the left and right ulna were 10.23 mm and 10.21 mm, respectively, and the Bd values of the left and right ulna were 15.66 mm and 15.10 mm, respectively. According to the statistical results, it was observed that all right and left measurement parameters of the ulna did not show a significant difference between male and female genders with a value of $p > 0.05$ (Table 1).

In the morphometric examination of the radius, the average left and right GL values were 128.54 mm and 129.37 mm, respectively, the average left and right SC values were 5.12 mm and 5.06 mm, the average left and right Bp values were 10.12 mm and 10.21 mm respectively determined. Additionally, left and right Bd values were 9.03 mm and 8.30 mm. It was revealed statistically ($p > 0.05$) that there was no difference between male and female genders in all right and left measurement parameters, as in the humerus and ulna bones (Table 1).

In addition, morphometric left or right-sided variations of the humerus, ulna and radius bones were examined in Red

hawks, separately in male and female genders. In this context, Bp and GL measurement parameters of the humerus in tercel showed a positive difference on the right side with a value of $p = 0.003$ (Table 2). Similarly, when the ulna was examined, the Bd and SC measurement parameters of the ulna in tercel showed a positive difference on the left side, with values of $p = 0.016$ and $p = 0.001$, respectively (Table 2). When the Bd and GL measurement parameters of the radius in males were examined, it was determined that the Bd measurement showed a positive difference in the left direction with the value of $p = 0.003$ and the GL measurement showed a positive difference in the right direction with the value of $p = 0.021$ (Table 2).

When all measurement parameters of the humerus, ulna and radius were compared in the right/left direction in terms of female gender, all measurement parameters of the humerus and radius did not show any difference with a $p > 0.05$ value (Table 2). However, contrary to the stated situation, it was determined that the ulna showed a positive difference in the left direction only with the SC measurement parameter $p = 0.018$ (Table 2).

Table 1: Statistical examination of gender characteristics of measurement subjects of humerus, ulna and radius bones.

	Gender	Humerus			Ulna			Radius		
		Mean value	Standard deviation	p-value	Mean value	Standard deviation	p-value	Mean value	Standard deviation	p-value
Left Bp	Male	28.61	.452	0.493	10.25	.559	0.918	10.14	.511	0.924
	Female	28.29	.601		10.20	.233		10.10	.197	
	Generally	28.51	.472		10.23	.446		10.12	.406	
Left Bd	Male	21.70	.393	0.781	15.75	.726	0.662	9.05	.325	0.839
	Female	21.43	.523		15.48	.452		8.99	.162	
	Generally	21.61	.409		15.66	.614		9.03	.263	
Left GL	Male	125.15	.295	0.796	140.24	.502	0.138	128.44	.426	0.401
	Female	125.03	.862		139.55	.028		128.74	.035	
	Generally	125.11	.452		140.01	.530		128.54	.364	
Left SC	Male	9.73	.491	0.498	8.04	.530	0.580	5.14	.329	0.828
	Female	10.02	.212		8.28	.063		5.09	.042	
	Generally	9.83	.418		8.12	.429		5.12	.257	
Right Bp	Male	29.57	.436	0.102	10.78	.502	0.601	10.26	.356	0.623
	Female	28.88	.049		10.57	.084		10.12	.127	
	Generally	29.34	.492		10.71	.406		10.21	.291	
Right Bd	Male	21.04	.665	0.781	15.21	.530	0.446	8.39	.409	0.437
	Female	20.89	.176		14.87	.077		8.10	.332	
	Generally	20.99	.527		15.10	.447		8.30	.381	
Right GL	Male	126.33	.467	0.244	139.88	.827	0.982	129.79	.948	0.162
	Female	125.85	.042		139.90	.325		128.53	.445	
	Generally	126.17	.439		139.89	.657		129.37	.892	
Right SC	Male	10.01	.480	0.775	7.13	.493	0.874	5.13	.382	0.538
	Female	10.18	.954		7.19	.021		4.93	.148	
	Generally	10.07	.572		7.15	.383		5.06	.320	

GL: Length of bone; SC: The smallest corpus width of bone; Bp: Proximal width of bone; Bd: Distal width of bone. * $p < 0.05$: Significance levels according to Mann-Whitney U test.

Table 2: Statistical analysis of measurement parameters of humerus, ulna and radius bones in terms of direction (right/left).

Gender	Direction	Humerus			Ulna			Radius		
		Mean value	Standard deviation	p-value	Mean value	Standard deviation	p-value	Mean value	Standard deviation	p-value
Male	Left/Bp	28.61	.220	0.003*	10.25	.419	0.085	10.14	.196	0.293
	Right/Bp	29.57			10.78			10.26		
	Left/Bd	21.70	.428	0.055	15.75	.218	0.016*	9.05	.149	0.003*
	Right/Bd	21.04			15.21			8.39		
	Left/GL	125.15	.258	0.003*	140.24	.346	0.127	128.44	.605	0.021*
	Right/GL	126.33			139.88			129.79		
	Left/SC	9.73	.244	0.106	8.04	.069	0.001*	5.14	.177	0.876
	Right/SC	10.01			7.13			5.13		
Female	Left/Bp	28.29	.551	0.372	10.20	.148	0.178	10.10	.325	0.945
	Right/Bp	28.88			10.57			10.12		
	Left/Bd	21.43	.346	0.273	15.48	.374	0.263	8.99	.494	0.239
	Right/Bd	20.89			14.87			8.10		
	Left/GL	125.03	.820	0.392	139.55	.296	0.344	128.74	.480	0.648
	Right/GL	125.85			139.90			128.53		
	Left/SC	10.02	.742	0.806	8.28	.042	0.018*	5.09	.106	0.287
	Right/SC	10.18			7.19			4.93		

GL: Length of bone; SC: The smallest corpus width of bone; Bp: Proximal width of bone; Bd: Distal width of bone. *p<0.05: Significance levels according to Wilcoxon test.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The existence of many birds of prey, especially red hawks, is necessary for the protection and continuity of natural balance. However, the numbers of birds of prey are decreasing due to the destruction of natural life, various accidents and hunting (injuring with firearms) (Coles 1985; Umar 1999). In many countries, including Turkey, legal regulations have been made regarding the hunting of birds of prey (Bostan 2000). Considering the conditions stated within the scope of the study, the materials used in the research were obtained from dead animals in order to prevent livestock losses and injuries.

In addition, it is thought that a total of six tissue samples belonging to males and females in the study are sufficient to explain the anatomy of the humerus and antebrachium in the endangered Red hawk species.

Most of the injuries that occur in wild animals due to various reasons are traumatic (Punch 2001; Deem et al. 2002; Buttle 2004). For this reason, radiological imaging methods are the most useful methods that veterinary clinicians can use in the diagnosis and treatment of injured or traumatized animals in the wild (Valente 2007; Borges et al. 2017). In addition, biochemical parameters cannot be used much during the diagnosis of injured wild animals. However, techniques such as radiography, computed tomography and magnetic resonance contribute significantly to the evaluation of biological data in endangered species and wildlife because they provide the best view of anatomical structures and organs, are non-invasive, and allow sensitive diagnoses (İşler 2018).

In accordance with general principles, the winged skeleton is very similar to the skeletal system of mammals. However, due to some ecological and biological factors, it

can be said that avian and mammalian skeletal systems have many morphological features that differ from each other (Gültekin 1974).

In a study conducted on chickens, domestic ducks, pigeons and quails, the humerus was examined morphologically. In this context, it was reported that there was a caput humeri at the proximal end, a tuberculum laterale at the dorsolateral of the caput, and a crista tuberculi laterale extending outwards and downwards from here (Yıldız et al. 1998). It has also been stated that there is a tuberculum mediale in the dorsomedial part of the caput and a foramen pneumaticum, a large air hole, in the medial and distal parts of this medial tuber (Yıldız et al. 1998). It has been mentioned that there is a condylus ulnaris and a smaller condylus radialis at the distal end (Yıldız et al. 1998). Similarly, the morphology of the antebrachium bones (ulna and radius) has also been revealed (Yıldız et al. 1998).

When the humerus, ulna and radius in red hawks were examined morphologically, they showed complete agreement with the study in question. Studies have shown that the average length of the humerus has been reported; 72.5 mm in chickens, 46.1 mm in pigeons and 87.4 mm in domestic ducks (Yıldız et al. 1998), 67.77±0.55 mm in pheasants and 51.80±0.49 mm in partridges (Lök and Yalçın 2007), 172.5 mm in goose (Allison et al. 2006). In addition, the average length of the humerus has been reported 191.28±1.44 mm in male Kars goose, 175.02 mm, in female Kars goose (Dursun 2008), 12.20 cm in Pariah kite (Tiwari et al. 2011), 36.13±1.32 mm in Japanese quail (Demiraslan et al. 2014), 106 mm in male ducks, 95.84±1.63 mm in female ducks (Çevik Demirkan 2002), 62.3±4.11 mm in Commercial chickens and 58.0±1.41 mm in Desi chicken (Vistro et al. 2015).

According to the results of our study, the average humeral length in Red hawks was determined to be 125.11 mm in the left extremity and 126.17 mm in the right extremity, regardless of gender. In this context, it has been observed that Red hawks have the longest humerus among domestic and wild birds, other than geese species.

Humerus width is stated; 12.50±0.27 mm in male Kars goose, 11.84±0.35 in female Kars goose (Doğan and Takçı 2021), 2.30 cm in Pariah kite (Tiwari et al. 2011), 0.75±0.08 mm in Japanese quail (Demiraslan et al. 2014), 7.9±1.66 mm in Commercial broilers and 6.1±0.74 mm in Desi chicken (Vistro et al. 2015). In line with the results of our study, it was determined that the average humeral width in Red hawks, regardless of gender, was 9.83 mm in the left extremity and 10.07 mm in the right extremity. In this context, it has been observed that red hawks have the widest humerus among domestic and wild birds other than the geese species. It has been stated that the average ulna length in male domestic ducks is 100.1±3.0 mm (Charuta et al. 2005).

In addition, the ulna length was reported as 61.53±0.50 mm in pheasants (Lök and Yalçın 2007), 29.4 mm in wild quails, 29.7 mm in domestic quails (Yaman 1997), 13.60 cm in Pariah kite (Tiwari et al. 2011), 31.39±0.81 mm in Japanese quail (Demiraslan et al. 2014). The average width of the ulna has been reported 1.80 cm in the Pariah kite (Tiwari et al. 2011), 9.40-0.24 mm in the male Kars goose, and 8.72-0.32 mm in the female Kars goose (Doğan and Takçı 2021), and 0.69-0.12 mm in Japanese quails (Demiraslan et al. 2014).

The radius length was reported as 56.09±0.47 mm in pheasants (Lök and Yalçın 2007), 169.75±1.31 mm in male Kars goose, 154.20±1.63 mm in female Kars goose (Doğan and Takçı 2021), 91.0±13.59 mm in male Peking duck, 94.9±2.1 mm in female Peking duck (Charuta et al. 2005), 31.22±1.21 cm in Griffon vulture, 20.74±0.82 cm in flamingo (Frongia et al. 2021), 13.20 cm in Pariah kite (Tiwari et al. 2011) and 28.12±0.60 mm in Japanese quail (Demiraslan et al. 2014). The average width of the radius has been reported to be 1.10 cm in Pariah kite (Tiwari et al. 2011), 6.28±0.28 mm in male Kars goose, 5.94±0.21 mm in female Kars goose (Doğan and Takçı 2021), and 0.35±0.05 mm in Japanese quail (Demiraslan et al. 2014).

According to the research results, the average Ulna length and width in the left extremity in Red hawks were determined as 140.01 mm and 8.12 mm, respectively, regardless of gender. The average length and width of the right extremity were determined as 139.89 mm and 7.15 mm, respectively. In addition, the average length and width of the left limb radius in Red hawks, regardless of gender, were 128.54 mm and 5.12 mm, respectively. Similarly, the average length of the right extremity radius was determined as 129.37 mm and its width was 5.06 mm.

When all studies are evaluated collectively, it is clearly seen that the ulna bone is thicker than the radius bone. Many studies include the average widths of the extremitas proximalis and extremitas distalis parts of the humerus, ulna and radius bones. Within the scope of the study, the average proximal and distal limb widths of Red hawks are similar to the results of the above-mentioned studies (Table 1 and 2).

In a study in which the front extremity bones of Red hawks were dissected and measured using calipers, the humerus It has been reported to be 10.5-11.7 cm in length, 0.75-0.90 cm in width. The ulna has been reported to be 11.4-13.2 cm in length, 0.56-0.78 cm in width and the radius has been reported to be 10.8-12.3 cm in length, 0.35-0.44 cm

in width (Atalar et al. 2007). When the results of this study were compared with these results, it was seen that there was complete agreement. For this reason, it can be said that 3D images created by the computerized tomography method are an alternative method that can be used in live animals for morphological and morphometric measurements.

As a result, our study has shown that the anatomy of all wild animals, especially endangered birds of prey, can be examined with radiological imaging techniques such as computed tomography. We also believe that the results of this study will contribute greatly to the surgical treatment and care processes for humerus and antebrachium injuries in birds of prey.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: VD, ZS, CG
Supervision / Consultancy: VD, ZS, CG
Data Collection and / or Processing: VD, CG, LA
Analysis and / or Interpretation: VD, ZS, CG, LA, GÇ
Writing the Article: VD, ZS
Critical Review: VD, ZS, CG, LA, GÇ

REFERENCES

- Allison R, Tumarkin-Deratzian, David RV et al. (2006). Bone surface texture as an ontogenetic indicator in long bones of the Canada goose *Branta canadensis* (Anseriformes: Anatidae). *Zool J Linn Soc*, 148, 133-168.
- Aslan L, Adizel Ö, Karasu A et al. (2009). Treatment of injuries and fractures in wild birds in the Van Lake basin between 2006 and 2008. *YYU Vet Fak Derg*, 20 (2), 7-12.
- Atalar Ö, Kürtül İ, Özdemir D (2007). Morphological and morphometric approach to the bones of the wings in the Long-Legged Buzzard (*Buteo Ruffinus*). *Firat Univ Sağlık Bilim Vet Derg*, 21 (4), 163-166.
- Baumel JJ, Club NO (1993). *Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium*. 2nd edition, Massachusetts Published by the club, Cambridge.
- Bhargavi S, Venkatesan S, Ramesh G et al. (2017). Morphometrical analysis of the wing of the Blue-and-Yellow macaw (*Ara ararauna*) with reference to the Aerodynamics. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 6 (8), 2707-2710.
- Bonsler RH (1995). Longitudinal variation in mechanical competence of bone along the avian humerus. *J Exp Biol*, 198 (1), 209-212.
- Borges NC, Cruz VS, Fares NB (2017). Morphological evaluation of the thoracic, lumbar and sacral column of the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla* linnaeus, 1758). *Pesqui Vet Bras*, 37 (4), 401-407.
- Bostan B (2000). *Our Birds of Prey*. İskenderun Environmental Protection Association Publications, Hatay.
- Buttle EP (2004). Concomitant leg injuries in raptors with wing damage. *J S Afr Vet Assoc*, 75, 154.
- Çevik Demirkan A (2002). Skeletal system in duck. PhD. Thesis, Akara University Health Sciences Institute, Ankara.
- Charuta A, Bartyzel BJ, Karbowicz M et al. (2005). Morphology and morphometry of the antebrachial skeleton and bones of hand of the domestic Pekin duck. *Vet Zootech-Lith*, 51, 26-30.
- Coles BH (1985). *Avian Medicine and Surgery*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- D'Urso PS, Barker TM, Earwaker WJ et al. (1999). Stereolithographic biomodelling in cranio-maxillofacial surgery: a prospective trial. *J Craniomaxillofac Surg*, 27 (1), 30-37.
- Deem SL, Terrell SP, Forrester DJ (2002). A retrospective study of morbidity and mortality of raptors admitted to Colorado State University Veterinary Teaching Hospital during 1995 to 1998. *J Wildl Dis*, 38, 101-106.
- Demiraslan Y, Tufan T, Sari M et al. (2014). The effect of clinoptilolite on long bone morphometry in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Vet Anim Sci*, 2 (6), 179-183.

- Demircioğlu İ, Doğan GK, Karaavci FA et al. (2020).** Three-dimensional modelling and morphometric investigation of computed tomography images of brown bear's (*Ursus arctos*) ossa cruris (*Zeugopodium*). *Folia Morphol*, 79 (4), 811-816.
- Demirsoy A (1992).** Basic rules of life. Vertebrates/Amniota (reptiles, birds and mammals), Volume III/Part II, Meteksan İnc, Ankara.
- Doğan GK, Takçı İ (2021).** A macroanatomic, morphometric and comparative investigation on skeletal system of the geese growing in Kars region II; Skeleton appendiculare. *BSJ Health Sci*, 4 (1), 6-16.
- Dursun N (2008).** Anatomy of Domestic Birds. Medisan Publishing House, Ankara.
- Frongia GN, Naitana S, Farina V et al. (2021).** Correlation between wing bone microstructure and different flight styles: the case of the griffon vulture (*Gyps fulvus*) and greater flamingo (*Phoenicopterus roseus*). *J Anat*, 239 (1), 59-69.
- Gültekin M (1974).** Evil Comparative Osteologia of Mammals and Canals. Ankara University Press, Ankara.
- İşler CT (2018).** Use of radio-diagnostic technique in wild animals. *Cumhur Medical J*, 3 (2), 24-28.
- Kibar M, Bumin A (2006).** Evaluation of fractures resulting from gunshot wounds in birds of prey: 85 cases (1998-2005). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 12 (1), 11-16.
- Lök S, Yalçın H (2007).** Comparative macroanatomical studies on wing bones (*ossea alae*) in rock partridge (*A. Graeca*) and pheasants (*P. Colchicus*). *J Vet Sci*, 21, 85-94.
- Novitskaya E, Ruestes CJ, Porter MM et al. (2017).** Reinforcements in avian wing bones: Experiments, analysis, and modeling. *J Mech Behav Biomed Mater*, 76, 85-96.
- Orhan İÖ, Özgel Ö, Kabak M (2002).** Neurocranium bones in the Red hawk (*Buteo rufinus*). *Vet J Ankara Univ*, 49, 153-157.
- Prokop M (2003).** General principles of MDCT. *Eur J Radiol*, 45 (1), 4-10.
- Punch P (2001).** A retrospective study of the success of medical and surgical treatment of wild Australian raptors. *Aust Vet J*, 79, 747-752.
- Tiwari Y, Pandey A, Shrivastav AB et al. (2011).** Gross morphometrical studies on pectoral limb of Pariah kite (*Milvus migrans*). *Annu Res Rev Biol*, 1 (4), 111-116.
- Umar S (1999).** Hunting and Wildlife Conservation Development and Promotion Foundation Publication No. 3. Boyut Publishing, İstanbul.
- Valente ALS (2007).** Diagnostic imaging of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). PhD Thesis, Universidad Autonoma de Barcelona, Spain.
- Verhoff MA, Ramsthaler F, Krähahn J et al. (2008).** Digital forensic osteology possibilities in cooperation with the Virtopsy project. *Forensic Sci Int*, 174 (2-3), 152-156.
- Vistro WA, Kalhor IB, uddin Shah MG et al. (2015).** Comparative anatomical studies on humerus of Commercial broiler and Desi chicken. *Int J Acad*, 6 (6), 153-158.
- Von Den Driesch A (1976).** A guide to the measurement of animal bones from archaeological sites. Peabody Museum Bulletin I, USA.
- Yaman M (1997).** Comparison of biometric measurements of the humerus, radius, ulna and manus bones that form the wing skeleton in domestic and wild subspecies of quail, *Coturnix coturnix* Linnaeus, 1758 (*Aves: Gall.*). MSc, Selçuk University Institute of Science and Technology, Konya.
- Yıldız H, Yıldız B, Eren G (1998).** Morphometric research on humerus and antebrachium bones in chickens, domestic ducks, pigeons and quails. *Uludağ Univ Vet Fak Derg*, 17 (1), 87-91.



Buzağlarda Probiyotik ve Mannan-Oligosakkarit Kullanımının Performans, Hastalık, Yaşama Oranı ve Karlılık Üzerine Etkisi

Mehmet KÜÇÜKOFLAZ^{1,*} Berrin KOCAOĞLU GÜÇLÜ² Veli ÖZBEK³ Savaş SARIÖZKAN⁴

¹Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, 36000, Kars, Türkiye

²Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 38000, Kayseri, Türkiye

³Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları Anabilim Dalı, 38000, Kayseri, Türkiye

⁴Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Hayvan Sağlığı Ekonomisi ve İşletmeciliği Anabilim Dalı, 38000, Kayseri, Türkiye

Geliş Tarihi: 02.12.2023

Kabul Tarihi: 02.02.2024

ÖZ

Araştırma buzağlara probiyotik (EM-Etkin Mikroorganizmalar) ve mannan-oligosakkarit (MOS)'in ayrı ayrı veya birlikte verilmesinin canlı ağırlık artışı (CAA), yem tüketimi (YT), yemden yararlanma (YY) gibi büyüme parametreleri, vücut ölçüleri, hastalık ve yaşama oranı ile buzağı yetiştirme maliyetlerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Çalışmada 76 baş (38 baş Holstein ve 38 baş Simmental, 38 adet erkek, 38 adet dişi, 7±3 günlük yaşlı, 38±2 kg CA) buzağı, her grupta 19 buzağı olacak şekilde bir kontrol ve 3 deneme grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Deneme grubunda bulunan buzağlara kontrol grubundan farklı olarak 10 ml EM, 5 g MOS veya 10 ml EM+5 g MOS süte katılarak verildi. Çalışma sonunda süt emme döneminde buzağlara EM, MOS veya EM+MOS verilmesinin canlı ağırlık (CA), CAA, kuru madde tüketimi (KMT), YY, vücut ölçüleri ve hastalık oranı ile ekonomik göstergeleri (toplam maliyet, toplam gelir ve net kar) önemli oranda etkilemediği belirlendi (p>0.05). Sonuç olarak, tercih edilecek alternatif yem katkı maddeleri hem hayvan performansını iyileştirecek hem de işletme ekonomisine katkı sunacak nitelikte olmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Buzağı, Kar, Performans, Prebiyotik, Probiyotik.

ABSTRACT

Effect of Probiotic and Mannan-Oligosaccharide Use on Performance, Disease, Survival Rate and Profitability in Calves

The research was carried out to determine the effect of giving probiotics (EM-Effective Microorganisms) and mannan-oligosaccharide (MOS) to calves, separately or together, on growth parameters such as live weight gain (LWG), feed consumption (FC), feed efficiency (FE), body measurements, disease and survival rate with calf breeding costs. In the study, 76 calves (38 Holsteins and 38 Simmentals, 38 males, 38 females, 7±3 days old, 38±2 kg LW) were divided into 4 groups, including control group and 3 experimental groups, with 19 calves in each group. Unlike the control group, calves in the trial group were given 10 mL EM, 5 g MOS or 10 mL EM+5 g MOS by adding them to the milk. At the end of the study, it was determined that giving EM, MOS or EM+MOS to calves during the pre-weaning period did not significantly affect live weight (LW), LWG, dry matter consumption (DMC), FE, body measurements, disease rate and farm economy (total cost, total income and net profit). As a result, alternative feed additives to be preferred should both improve animal performance and contribute to the enterprise's economies.

Keywords: Calf, Performance, Prebiotic, Probiotic, Profit.

GİRİŞ

Süt sığırcılığı işletmelerinin üretim ve ekonomik açıdan sürdürülebilirliği, buzağı sağlığı ve bakımı ile doğrudan ilişkilidir (Murray ve ark. 2016; Nor ve ark. 2012; Stanton ve ark. 2012). Sütten kesim öncesi dönem; buzağların en hassas olduğu, hastalık ve ölümlerin en yüksek olduğu dönemdir. Buzağlarda özellikle yaşamın ilk aylarında ortaya çıkan gastrointestinal enfeksiyonlar; büyümenin gerilemesine, işletmede tedavi giderlerinin ve buzağı ölüm oranlarının artmasına, dolayısı ile işletme karlılığının

azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca işletmelerde buzağı ölümlerinin fazla olması, gelecekte hayvan popülasyonunu ve hayvansal üretimi olumsuz etkileyeceğinden ülkelerin gıda temininde zorluk yaşamasına ve uzun vadede dışa bağımlılığın yol açabilecektir. Bu nedenle, son yıllarda sağlıklı bir bağırsak mikrobiyomu, optimum büyüme performansı, hayvansal üretiminin sürdürülebilirliği ile karlı bir işletmecilik için buzağı beslemede kullanılabilecek probiyotikler, prebiyotikler ve bitki ekstraktları gibi alternatif yem katkı maddelerinin araştırıldığı çalışmalar



önem kazanmıştır (Ural ve ark. 2020; Zábanský ve ark. 2021).

Probiyotikler “canlıların bağırsaklarına yerleşerek çoğalan, sindirim kanalından emilmeyen, patojen mikroorganizmalara karşı etki gösteren, hayvanların yemi değerlendirme kabiliyetini artıran, çoğunlukla gram (+) ve fakültatif anaerob olan, bir grup canlı maya, mantar ve bakteri veya bunların kültürlerini içeren biyolojik ürünler” olarak adlandırılmaktadır (Kocaoğlu Güçlü ve Kara 2009). Yapılan bazı çalışmalarda, probiyotiklerin buzağı bağırsak sağlığını olumlu yönde etkileyerek hastalıkların süresini, şiddetini ve ölüm oranını azalttığı, günlük CAA, YY, konsantre ve kaba YT’ni artırdığı ve KM sindirilebilirliğini olumlu etkilediği bildirilmiştir (Daenicke ve Flachowsky 2001; Jatkauskas ve Vrotniakie 2010; Jukna ve ark. 2003; Morrison ve ark. 2010; Riddel ve ark. 2010, Timmerman ve ark. 2005; Ülger 2019).

Prebiyotikler ise, kalın bağırsakta doğal olarak bulunan bakterilerin hareketini ve sayısını düzenleyerek probiyotiklerin etkinliğini artıran kısa zincirli karbonhidratlar olarak tanımlanmaktadır. MOS (mayaların hücre duvarın ekstraktı) gibi prebiyotik kaynaklarının *Bacterioides*, *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, ve *Pediococcus*’lar gibi yararlı bakteriler tarafından sindirilebilmesi (Kocaoğlu Güçlü ve Kara 2009; Kuter ve ark. 2020), ayrıca bağırsak epitellerine tutunarak patojen bakterilerin kolonizasyonunu önlemesi neticesinde bağırsak sağlığı ve sindirimi olumlu etkilenmekte ve bu durum hayvanlarda büyüme performansını artırmaktadır. Öte yandan prebiyotiklerin, bağırsakta uçucu yağ asitleri miktarını artırması, bağırsak pH’sını düşürmesi ve patojenlerin bağırsak mukozasına adhezyonlarını engellemesi suretiyle ishali önlenmesinde önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Morrison ve ark. 2010; Riddel ve ark. 2010). Simbiyotikler ise prebiyotik ve probiyotiklerin kombinasyonlarıdır. Probiyotikler ve prebiyotiklerin birlikte kullanılmaları sonucu oluşan sinerjik etki canlı probiyotik hücre sayısının daha fazla olmasını sağlayarak yalnız kullanılmalarına göre daha etkili sonuçlar vermektedir (Kuter ve ark. 2020).

Bu çalışmada da buzağılara EM ve MOS kaynaklarının ayrı ayrı veya birlikte verilmesinin CAA, YT, YY, cidago yüksekliği (CY), sağrı yüksekliği (SY), beden derinliği (BD), göğüs çevresi (GÇ), vücut uzunluğu (VU) ve sağrı genişliği (SG) gibi vücut ölçüleri, hastalık ve yaşama oranı ile buzağı yetiştirme maliyetleri üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay tarih ve numarası: 06.07.2022 ve 22/158).

Araştırmanın materyalini özel bir entansif süt sığırcılığı işletmesinden temin edilen 76 baş (38 baş Holstein ve 38 baş Simmental, 38 erkek, 38 dişi) buzağı oluşturdu. Buzağular, benzer bakım-besleme uygulanan sürünün 2. ve 3. laktasyondaki ineklerin buzağılarından seçildi. Denemeye alınan tüm buzağılara; aşılamalar, boynuz köreltme, kolostral dönem beslemesi, altlık değişimi vb. uygulamalar aynı şekilde yapıldı. Buzağular deneme sonuna kadar bireysel buzağı kulübelerinde barındırıldı. Buzağular yaşları (7±3 günlük), canlı ağırlıkları, 38±2 kg) benzer olacak şekilde bir kontrol ve üç deneme grubu; EM, MOS ve EM+MOS olmak üzere her grupta 19 buzağı olacak şekilde toplam 4 gruba ayrıldı. Tüm buzağular doğumdan sonraki ilk 30 dakika içinde biberonla beslendi. Çalışmada

tüm buzağılara canlı ağırlıklarının %8-10’u kadar kolostrum 3 öğünde verildi. Araştırma boyunca (30 gün) her buzağıya ortalama 5.8 lt/gün tam yağlı süt (38 °C) biberonla verildi. Araştırma süresince buzağılara pelet formda buzağı başlangıç yemi (%90) ve yonca kuru otu (%10) karışımı ile su ad-libitum şeklinde verildi. Araştırmadaki bütün buzağular bireysel bölmelerde ve rutin bakım besleme şartlarında tutuldu. Kontrol grubunda bulunan buzağılara katkı maddesi içermeyen yalnızca süt ve katı yem verilirken, deneme grubunda yer alan buzağular kontrol grubundan farklı olarak, EM grubunda; buzağı başına günlük 10 ml EM ve MOS grubunda günlük 5 g MOS ve EM+MOS grubunda ise 10 ml EM ile 5 g MOS süte katılarak oral yolla içirildi. Buzağuların YT’ni belirlemek için verilen yemler ve tüketilmeyen yemler günlük tartıldı. Toplam KMT, süttten alınan KM ve katı yemden alınan KM (başlangıç yemi+yonca kuru otu) toplamından hesaplandı. YY, tüketilen toplam KM’nin (süt KM+katı yem KM) buzağuların toplam CAA’na bölünmesiyle hesaplandı.

Araştırmada kullanılan EM (Agriton®, Okinova, Japonya), *Lactobacillus casei* *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, ve *Lactobacillus rhamnosus* laktik asit bakterileri ve *Saccharomyces cerevisiae* mayası içermektedir. Bu ticari katkı maddesi 1*10⁷ cfu/g mikroorganizma içerir ve pH değeri 3-3.85’dir. Çalışmada kullanılan buzağı başlangıç yemi, yonca otu ve süttün kimyasal bileşimleri Tablo 1’de verilmiştir.

Mos içeriğinde aktif madde olarak (Nature Moss®); İnaktif maya ve maya hücre duvarı, katkı maddesi olarak *saccharomyces cerevisiae* bulunmaktadır.

Tablo 1: Başlangıç yemi, yonca otu ve süttün kimyasal bileşimleri.

Table 1: Chemical compositions of starter feed, alfalfa hay and milk.

Besin Bileşenleri	Buzağı Başlangıç Yemi	Yonca Samanı	Süt
KM, %	91.35	92.86	12.76
Ham protein, %	20.45	16.47	3.39
Ham kül, %	7.71	11.52	-
Ham selüloz, %	7.30	21.10	-
Yağsız KM, %	-	-	8.83

Buzağular araştırmanın başında (0. gün) ve sonunda (30. gün) 100 g hassasiyetli kantar ile tartıldı ve CA’ları kaydedildi. Araştırmanın başında ve sonunda bütün buzağuların her birinin CY, SY, BD, GÇ, VU ve SG bir mezura ve bir ölçüm çubuğu kullanılarak beslenmeden önce ölçüldü. Araştırma süresince buzağular hastalık belirtisi (ishal, ateş vb.) açısından gözlemlendi ve görülen semptomlar, uygulanan tedaviler ve kullanılan ilaçlar kayıt altına alındı.

Ekonomik Analizler

Ekonomik analizde; buzağı besleme, tedavi ve kontrol harcamaları dikkate alınırken diğer masraf unsurları (su, elektrik gibi) bütün gruplarda eşit olduğundan toplam maliyet hesaplamasına dâhil edilmemiştir. Araştırmada kullanılan buzağı başlangıç yeminin fiyatı 8.5 TL/kg, yonca kuru ot fiyatı 6 TL/ kg, süt fiyatı 13.2 TL/lt, MOS fiyatı 70 TL/kg, EM fiyatı 240 TL/lt olarak alındı. Toplam gelir hesaplamasında buzağı fiyatı 300 TL/kg CA olarak kabul edilmiştir.

Karlılık, toplam gelirden toplam maliyetin çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. Buzağı beslemede EM ve MOS kullanımının etkilerini belirlemek için kısmi bütçe analizi yapılmıştır. Kısmi bütçe analizi ile işletme/üretim sistemlerinde yapılacak herhangi bir değişikliğin, yürütülmekte olan faaliyete pozitif veya negatif etkisi belirlenmektedir. Kısmi bütçe analizindeki "Azalan Maliyetler" ve "İlave Gelir Artışı" yürütülen faaliyete pozitif yönde katkı sağlarken; "İlave Maliyetler" ve "Azalan Gelir" ise olumsuz etki oluşturmaktadır. Kısmi bütçe analizinde net gelirin hesaplanması aşağıdaki belirtilen formül yardımıyla yapılmaktadır;

$$\text{Net Gelir} = (\text{İlave gelir artışı} + \text{Azalan maliyetler}) - (\text{Azalan gelir} + \text{İlave maliyetler})$$

İstatistiksel Analiz

Çalışmada, buzağuların CA, vücut ölçüleri, katı ve sıvı KM tüketim miktarları ve ekonomik analiz sonuçlarına ait veriler One-Way ANOVA testi kullanılarak analiz edilmiştir. Hastalık oranları ki-kare testi (SPSS ver. 22.0) ile değerlendirilmiştir. Gruplar arasındaki farkları belirlemek için Duncan'ın çoklu aralık testi uygulanmıştır. Veriler ortalama ± standart hata ($X \pm S_x$) şeklinde verildi.

BULGULAR

Araştırma gruplarına ait CA, CAA, KMT ve YY değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Çalışmada buzağulara EM ve MOS'un ayrı ayrı veya birlikte verilmesinin CA, CAA YT, KMT ve YY etkilemediği belirlenmiştir ($p > 0.05$). Ancak tüm deneme gruplarında YT ve CAA kontrol grubuna göre rakamsal olarak artış göstermiştir. En iyi YY EM grubunda, en iyi CA ve CAA'ı EM+MOS verilen grupta bulunmuştur (Tablo 2). Araştırmada kontrol ve deneme gruplarında elde edilen vücut ölçüleri Tablo 3'te verilmiştir. Çalışmada, kontrol ve deneme gruplarında yer alan buzağulara ait vücut ölçüleri arasında önemli bir farklılık bulunmamıştır ($p > 0.05$; Tablo 3). Çalışma boyunca buzağılarda görülen hastalık oranları Tablo 4'te verilmiştir. Gruplar arasında hastalık oranları açısından istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Ancak hastalık görülme oranı en yüksek kontrol grubunda, en düşük ise EM+MOS grubunda tespit edilmiştir ($p > 0.05$; Tablo 4). Çalışmada boyunca (30 gün) kontrol ve deneme grupları için hesaplanan masraf unsurları (beslenme, tedavi ve hastalık kontrol harcamaları) Tablo 5'te verilmiştir. Çalışmadaki kontrol ve deneme grupları arasında beslenme masrafları bakımından istatistiksel farklılık önemli bulunmuştur. MOS grubunda beslenme masrafları kontrol grubuna benzer ancak EM ve EM+MOS grubunda kontrol grubundan önemli oranda yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Öte yandan tedavi giderleri ve toplam maliyet yönünden kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel bir farklılık görülmemiştir ($p > 0.05$; Tablo 5).

Buzağılarda EM ve MOS kullanımının işletmenin ekonomik göstergelerine (toplam maliyet, toplam gelir ve net kar) etkisi Tablo 6'da verilmiştir. Çalışmada yer alan kontrol ve deneme grupları arasında toplam maliyet, toplam gelir ve net kar bakımından istatistiksel farklılık tespit edilmemiştir ($p > 0.05$). Ancak toplam gelir yönünden EM ve EM+MOS grubu kontrol grubuna göre sırasıyla buzağı başı %2.0 ile %3.5 daha fazla gelir sağlarken, net kar bakımından yine EM ve EM+MOS grubu kontrol grubuna göre sırasıyla buzağı başı %2.2 ila %4.0 daha fazla kar sağlamıştır (Tablo 6).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Buzağılarda yaşamın ilk ayları (özellikle neonatal dönem) buzağuların gelecekteki performansı ile işletmenin üretim ve karlılığı için kritik öneme sahiptir. Sığır yetiştiriciliğinde hayatta kalabilen ve üretime katılabilen buzağular geleceğin et, süt, damızlık hayvan kaynakları olup, işletmelerin ekonomik olarak sürdürülebilirliğini sağlamaktadır. Genç hayvanların hızlı bir şekilde büyümeleri ve sağlıklı olmaları ekonomik açıdan önemli olup, bu sindirim sisteminin gelişimi ile yakından ilişkilidir. Yeni doğan buzağuların sıklıkla doğum, aşılama, süttten kesim, boynuz kesme, nakil gibi stres faktörlerine maruz kalmaları ishal vakalarının ve ekonomik kayıpların artmasına ayrıca büyümenin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle süttten kesim öncesinde buzağuların probiyotik ve prebiyotik gibi katkılar almalarının rumen ekosisteminin optimizasyonu, rekabetçi baskılama ve rekabetçi dışlama gibi mekanizmalarla dengeli bir bağırsak mikrobiyotası, güçlü ve etkin bir sindirim sistemi ile iyi işleyen bir bağırsıklık tepkisi oluşturarak buzağuların yaşamlarının ilk dönemlerinde şekillenebilecek ishal vakalarının azalmasına ve büyüme performansının iyileşmesine yardımcı olabilecekleri ileri sürülmektedir (Wu ve ark. 2021). Mevcut çalışmada da EM ve MOS kullanımının neonatal dönemdeki (ilk 30 gün) buzağuların performans, hastalık (ishal görülme oranı), yaşama gücü ve karlılığa olan etkisi incelenmiştir. Buzağulara verilen EM ve MOS ayrı ayrı veya birlikte verilmesinin CA, CAA YT, KMT, YY ve vücut ölçülerine etkisi istatistiki önemde olmamakla birlikte, deneme gruplarında YT, CAA ve YY'nin kontrol grubuna göre rakamsal olarak daha yüksek olduğu, en iyi YY'nin 10 ml/gün/buzağı EM verilen grupta, en iyi CA ve CAA'nın da 10 ml/gün/buzağı EM 5 g/gün/buzağı MOS verilen grupta olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular probiyotiklerin ve prebiyotiklerin performansı (Büyüklük Beyzi 2012; Küçükoflaz ve ark. 2022; Terre ve ark. 2007; Tóth ve ark. 2020; Uzmay ve ark. 2011) önemli oranda etkilemediğini bildiren çalışma sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Yine mevcut çalışmayı destekler nitelikte olan, diğer çalışmalarda olduğu gibi Silva ve ark. (2012) mevcut çalışmaya benzer dozda kullandıkları prebiyotiğin (MOS) buzağılarda performansı önemli oranda etkilememesi de mevcut çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Öte yandan probiyotik ve prebiyotiklerin buzağılarda CA (Dar ve ark. 2022), CAA (Dar ve ark. 2022; Ghosh ve Mehla 2012), YT (Ghosh ve Mehla 2012; Heinrichs ve ark. 2003; Ruppert ve ark. 2023), YY (Dar ve ark. 2022; Ghosh ve Mehla, 2012), VU (Dar ve ark. 2022; Nehru ve ark. 2017; Noori ve ark. 2016), GÇ (Nehru ve ark. 2017; Windschitl 1991), CY (Bayatkouhsar ve ark. 2013; Diler ve Aydın 2009; Nehru ve ark. 2017; Noori ve ark. 2016) olumlu yönde etkilediğini bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Szewczuk ve ark. (2017) mevcut çalışmaya benzer dozda kullandıkları probiyotiğin, buzağılarda önemli oranda CA ve CAA sağladığını bildirmişlerdir. Syomiti ve ark. (2014) probiyotik (EM) kullandıkları buzağılarda KMT'nin kontrol grubundaki buzağulara göre önemli oranda yüksek olduğunu, ancak gruplar arasında CAA yönünden önemli bir farklılığın görülmediğini bildirmişlerdir.

Tablo 2: Buzağılara EM, MOS ve EM+MOS verilmesinin CA ve CAA, YT, KMT, YY üzerine etkisi.**Table 2:** Effect of giving EM, MOS and EM+MOS on LW and LWG, FC, DMC, FE to calves.

Parametre	Kontrol ($\bar{x} \pm S_x$)	EM ($\bar{x} \pm S_x$)	MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	EM+MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	p
Deneme başı CA, kg	38.9±1.1	38.8±1.5	38.4±1.2	39.3±1.1	0.990
Deneme sonu CA, kg	50.9±1.4	51.9±1.4	50.6±1.4	52.6±1.1	0.699
CAA, g/buzağı/gün	395.4±22.7	432.3±28.9	407.4±16.2	445.1±27.7	0.463
YT, g	245.9±15.0	253.9±23.4	250.0±15.7	250.5±18.9	0.987
KMT, g/gün	223.7±13.6	231.1±21.2	227.5±14.2	227.9±17.1	0.987
YY, gKM/gCAA	0.58±0.03	0.55±0.04	0.57±0.03	0.57±0.07	0.845

Tablo 3: Buzağılara EM, MOS ve EM+MOS verilmesinin vücut ölçülerine etkisi.**Table 3:** Effect of giving EM, MOS and EM+MOS on body measurements to calves.

Parametre	Kontrol ($\bar{x} \pm S_x$)	EM ($\bar{x} \pm S_x$)	MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	EM+MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	p
0. Gün CY	76.5±0.7	76.8±0.7	76.6±0.9	77.2±0.8	0.918
30. Gün CY	80.7±0.8	81.3±0.8	81.1±1.0	81.3±0.8	0.960
CYA	4.2±0.6	4.5±0.5	4.5±0.6	4.1±0.5	0.921
0. Gün SY	80.4±0.8	80.7±0.8	80.4±0.8	80.6±0.8	0.992
30. Gün SY	85.0±0.7	85.5±0.8	85.1±1.1	85.5±0.8	0.968
SYA	4.6±0.5	4.8±0.5	4.7±0.6	4.9±0.6	0.980
0. Gün VU	69.4±0.8	68.1±0.9	68.3±0.9	70.1±0.7	0.264
30. Gün VU	73.2±0.8	72.7±0.7	72.4±0.8	73.9±0.6	0.520
VUA	3.8±0.4	4.6±0.4	4.1±0.3	3.8±0.6	0.447
0. Gün BD	34.2±0.4	33.5±0.4	33.6±0.5	34.1±0.3	0.706
30. Gün BD	37.7±0.4	37.6±0.4	37.3±0.4	37.4±0.4	0.855
BDA	3.5±0.4	4.1±0.4	3.7±0.4	3.3±0.5	0.359
0. Gün GÇ	77.1±0.7	76.2±0.9	75.4±0.8	76.9±0.8	0.461
30. Gün GÇ	85.0±0.8	85.2±0.8	83.8±0.87	85.4±0.8	0.536
GÇA	7.9±0.5	9.00±0.5	8.4±0.6	8.5±0.5	0.469
0. Gün SG	22.6±0.2	22.3±0.4	22.5±0.3	22.7±0.3	0.783
30. Gün SG	24.3±0.3	24.6±0.2	24.1±0.3	24.6±0.2	0.500
SGA	1.7±0.2	2.3±0.2	1.6±0.3	1.9±0.3	0.257

Tablo 4: Buzağılara EM, MOS ve EM + MOS verilmesinin hastalık oranlarına etkisi.**Table 4:** Effect of giving EM, MOS and EM + MOS on disease rates to calves.

Hastalık	Kontrol (%)	EM (%)	MOS (%)	EM+MOS (%)	Toplam (%)
Pozitif	13 (32.5)	9 (22.5)	10 (25.0)	8 (20.0)	40 (100)
Negatif	6 (16.7)	10 (27.8)	9 (25.0)	11 (30.6)	36 (100)
İstatistiksel Değerler	N= 76; X ² =2.96; Sd=3; p=0.399				

Tablo 5: Buzağılara EM, MOS ve EM+MOS verilmesinin beslenme, tedavi ve kontrol masraflarına etkisi.**Table 5:** Effect of giving EM, MOS and EM+MOS on nutrition, treatment and control expenditure to calves.

Masraf Unsurları/Grup	Kontrol ($\bar{x} \pm S_x$)	EM ($\bar{x} \pm S_x$)	MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	EM+MOS ($\bar{x} \pm S_x$)	p
1. Besleme	2357.6 \pm 3.7 ^a	2431.5 \pm 5.8 ^b	2369.2 \pm 3.9 ^a	2441.3 \pm 4.7 ^b	0.001
Süt	2296.8	2296.8	2296.8	2296.8	
Yem	60.8	62.7	61.9	62.0	
Katkı Maddesi	0.0	72.0	10.5	82.5	
2. Tedavi	230.0 \pm 45.8	169.3 \pm 49.8	191.5 \pm 53.0	174.0 \pm 75.7	0.875
İlaç	109.2	109.0	118.2	86.5	
İşçilik	35.8	17.9	21.7	25.9	
Veteriner	85.0	42.4	51.6	61.6	
3. Kontrol harcamaları	210.7	210.7	210.7	210.7	
Toplam Maliyet (1+2+3)	2798.3 \pm 47.4	2811.5 \pm 52.1	2771.4 \pm 54.8	2826.0 \pm 74.6	0.923

Tablo 6: Buzağılara EM, MOS ve EM+MOS verilmesinin işletme ekonomisine etkisi ($\bar{x} \pm S_x$).**Table 6:** Effect of giving EM, MOS and EM+MOS on enterprises economics to calves.

Gruplar	Toplam Maliyet	Toplam Gelir	Net Kar
Kontrol	2798.3 \pm 47.4	15257.4 \pm 429.0	12459.0 \pm 419.0
EM	2811.5 \pm 52.1	15554.2 \pm 430.6	12742.4 \pm 431.3
MOS	2771.4 \pm 54.8	15178.4 \pm 423.9	12407.1 \pm 431.2
EM+MOS	2826.0 \pm 74.6	15784.7 \pm 322.8	12958.7 \pm 322.4
p	0.923	0.699	0.748

Buzağılar, çevresel değişikliklere ve patojenik bakteri kolonizasyonuna karşı hassasiyetleri nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip olabilir. Türkiye'de süt ve besi sığırı işletmelerinde buzağı hastalıkları neredeyse her işletmede görülmekte olup bu hastalıklarında yaklaşık %5-20'si ölümle sonuçlanmaktadır. Aile tipi işletmelerde buzağı ölüm oranları %50'ye çıkmakta ve önemli ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Demir ve ark. 2019; Küçükoflaz ve Sarıözkan 2023). Buzağı hastalık ve ölümlerinin başlıca sebeplerinden biri sindirim sorunlarıdır (sırasıyla %51 ve %32). Bu nedenle, buzağının erken yaşamında GIS performansını iyileştirmeye ve ishali azaltmaya yönelik stratejilerin uygulanması çok önemlidir. Çalışmada, doğum sonrası buzağılara içirilen probiyotik, prebiyotik ve simbiyotiklerin hastalık oranını azaltma eğiliminde olduğu en yüksek hastalık oranının kontrol grubunda en düşük hastalık oranının ise EM+MOS verilen grupta olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgu araştırmacıların daha önce yaptıkları araştırma sonuçlarını desteklemektedir (Küçükoflaz ve ark. 2022). Syomiti ve ark. (2014) probiyotik (EM) kullandıkları buzağılarda hastalık vakalarının probiyotik kullanılmayan buzağılara göre önemli oranda düşük olduğunu bildirmişlerdir. Aldana ve ark. (2009) yine mevcut çalışmaya benzer miktarda kullandıkları probiyotiğin buzağılarda hastalık vakalarını %40 oranında azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmada, toplam maliyet yönünden kontrol ve deneme grupları

arasında istatistiksel bir farklılık belirlenmemiş olsa da, kullanılan katkıların beslenme maliyetine etkisi katkıların fiyatı ile orantılı olarak değişiklik göstermiştir. MOS grubunda beslenme masrafları kontrol grubuna benzer ancak EM ve EM+MOS grubunda kontrol grubundan önemli oranda yüksek bulunmuştur. Öte yandan kontrol grubunda hastalık oranının (%32) deneme gruplarına (%20-25) göre yüksek olmasına bağlı olarak en yüksek tedavi masrafları kontrol grubunda belirlenmiştir. Çalışma sonuçları probiyotik ve prebiyotiklerin buzağılarda karlılığı (Dar ve ark. 2022; Ghosh ve Mehla 2012) olumlu yönde etkilediğini bildiren çalışmaların aksine buzağılara süttten kesim öncesi dönemde probiyotik ve/veya prebiyotik verilmesinin işletme karlılığında istatistiksel olarak önemli bir farklılığa neden olmadığını göstermiştir. Ancak EM ve EM+MOS grubu kontrol grubuna göre sırasıyla %2.0 ila %3.5 daha fazla gelir, %2.2 ila %4.0 daha fazla kar sağlamıştır. Elde edilen bulgular Uzman ve ark. (2011) ile Kara ve ark. (2015)'nin çalışma bulgularını desteklemektedir. Syomiti ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmaya göre kullanılan probiyotiğin hastalık vakalarını azaltmasından dolayı işletmelere ekonomik anlamda katkı sağladığını bildirmişlerdir. Araştırmacıların daha önce yaptıkları çalışma sonuçlarına göre, probiyotik (EM) kullanılan grubun kontrol grubuna göre %2 daha karlı olduğu ve mevcut çalışma bulgularını desteklediği görülmektedir (Küçükoflaz ve ark. 2022).

Sonuç olarak, hayvan yetiştiriciliği yapan işletmelerde kullanılacak olan alternatif yem katkı maddelerinin ticari pazarlama politikalarından etkilenmeden, bilimsel temellere dayanılarak, işletme ve ülke ekonomilerinin çıkarları gözetilerek tercih edilmesinin faydalı olacağı düşünülmektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: MK, SS, BKG
Denetleme/Danışmanlık: MK, BKG, SS
Veri Toplama ve/veya İşleme: MK, VÖ
Analiz ve/veya Yorum: MK, BKG
Makalenin Yazımı: MK, BKG, SS, VÖ
Eleştirel İnceleme: MK, BKG, SS

KAYNAKLAR

- Aldana C, Cabra S, Ospina CA, Carvajal F, Rodríguez F (2009).** Effect of a probiotic compound in rumen development, diarrhea incidence and weight gain in young Holstein calves. *Int J Agric Biol Eng*, 3 (9), 489-492.
- Bayatkouhsar J, Tahmasebi AM, Naserian AA, Mokarram RR, Valizadeh R (2013).** Effects of supplementation of lactic acid bacteria on growth performance, blood metabolites and fecal coliform and lactobacilli of young dairy calves. *Anim Feed Sci Technol*, 186 (1-2), 1-11.
- Büyükkılıç Beyzi S (2012).** Buzağlarda Yem Katkı Maddesi Olarak Probiyotik Performans ve Dışkı Karakteristikleri Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Türkiye.
- Daenicke R, Flachowsky G (2001).** Efficacy of the probiotic toyocerin on the performance of raising calves. In Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. 8. Symposium, Germany.
- Dar AH, Singh SK, Rahman JU, Ahmad SF (2022).** The effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and/or prebiotic mannan-oligosaccharides on growth performance, nutrient utilization, blood metabolites, faecal bacteria, and economics of crossbred calves. *Iran J Vet Res*, 23 (4), 322.
- Diler A, Aydın R (2009).** Rasyona probiyotikâ enzim kombinasyonu ilavesinin İsviçre Esmeri ırkı buzağlarda büyüme performansı ve yemden yararlanma ve sağlık üzerine etkileri. *Hay Üret*, 50 (2), 22-28.
- Ghosh S, Mehla RK (2012).** Influence of dietary supplementation of prebiotics (mannan-oligosaccharide) on the performance of crossbred calves. *Trop Anim Health Prod*, 44, 617-622.
- Güçlü BK, Kara K (2009).** Ruminant beslemede alternatif yem katkı maddelerinin kullanımı: 1. probiyotik, prebiyotik ve enzim. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 6 (1), 65-75.
- Heinrichs AJ, Jones CM, Heinrichs BS (2003).** Effects of mannan-oligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *J Dairy Sci*, 86 (12), 4064-4069.
- Jatkauskas J, Vrotniakiene V (2010).** Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. *Vet Med*, 55 (10), 494-503.
- Jukna Č, Jukna V, Šimkus A (2003).** The Effect of some probiotic preparations on calves' growth. *Bulg J Vet Med*, 6, 2.
- Kara C, Cihan H, Temizel M ve ark. (2015).** Effects of supplemental mannan-oligosaccharides on growth performance, faecal characteristics and health in dairy calves. *AJAS*, 28 (11), 1599.
- Kuter E, Gümüş H, Karakaş Oğuz F (2020).** Probiyotik ve prebiyotiklerin bağırsak sağlığı üzerine etkileri. Hayvan Beslemede Bağırsak Sağlığının Önemi. 1. Baskı. Türkiye Klinikleri, Ankara.
- Küçükoflaz M, Özbek V, Sarıözkan S, Kocaoğlu Güçlü B, Kara K (2022).** Growth performance, ruminal volatile fatty acids, health status and profitability in calves fed with milk supplemented with probiotics. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 28 (3), 421-430.

- Küçükoflaz M, Sarıözkan S (2023).** Entansif süt sağırılığında buzağı hastalıkları ve ölümlerine bağlı ekonomik kayıpların belirlenmesi. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 20 (2), 94-103.
- Morrison SJ, Dawson S, Carson AF (2010).** The effects of mannan-oligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. *Livest Sci*, 131 (2-3), 292-296.
- Murray CF, Fick LJ, Pajor EA ve ark. (2016).** Calf management practices and associations with herd-level morbidity and mortality on beef cow-calf operations. *Animal*, 10 (3), 468-477.
- Nehru Arun P, Sunandhadevi S, Rama T, Muniyappan N (2017).** Effect of probiotic supplementation on growth performance of crossbred calves in an organized cattle farm. *J Anim Health Prod*, 5 (3), 89-91.
- Noori M, Alikhani M, Jahanian R (2016).** Effect of partial substitution of milk with probiotic yogurt of different pH on performance, body conformation and blood biochemical parameters of Holstein calves. *J Appl Anim Res*, 44 (1), 221-229.
- Nor NM, Steeneveld W, Mourits MCM, Hogeveen H (2012).** Estimating the costs of rearing young dairy cattle in the Netherlands using a simulation model that accounts for uncertainty related to diseases. *Prev Vet Med*, 106 (3-4), 214-224.
- Riddell JB, Gallegos AJ, Harmon DL, McLeod KR (2010).** Addition of a *Bacillus* based probiotic to the diet of pre-ruminant calves: Influence on growth, health, and blood parameters. *Int J Appl Res Vet Med*, 8 (1), 78-85.
- Ruppert LD, McCoy GC, Bower NR, Hotjens MF (2023).** Probiotic supplemented calf diets. Erişim Tarihi: 03 Ekim 2023. Erişim Adresi: <http://www.Traill.Uiuc.edu/dairy.net>.
- Silva JTD, Bittar CMM, Ferreira LS (2012).** Evaluation of mannan-oligosaccharides offered in milk replacers or calf starters and their effect on performance and rumen development of dairy calves. *Rev Bras de Zootec*, 41, 746-752.
- Stanton AL, Kelton DF, LeBlanc SJ, Wormuth J, Leslie KE (2012).** The effect of respiratory disease and a preventative antibiotic treatment on growth, survival, age at first calving, and milk production of dairy heifers. *J Dairy Sci*, 95 (9), 4950-4960.
- Syomiti M, Bauni M, Kariuki IW, Gachuri C, Mutua S, Malala D (2014).** Evaluation of early calves' weaning diet as milk replacer for smallholder dairy production systems in Kenya. *Afr Crop Sci J*, 22, 951-957.
- Szewczuk M, Nowik P, Olejnik K, Jędrzych L, Kruszyński W (2017).** Influence of the EMTM series probiotic agents on the results of rearing of Polish Holstein-Friesian calves. *Acta Sci Pol Zootech*, 14 (4), 141-150.
- Terre M, Calvo MA, Adelantado C, Kocher A, Bach A (2007).** Effects of mannan oligosaccharides on performance and microorganism fecal counts of calves following an enhanced-growth feeding program. *Anim Feed Sci Technol*, 137 (1-2), 115-125.
- Timmerman HM, Mulder L, Everts H ve ark. (2005).** Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J Dairy Sci*, 88 (6), 2154-2165.
- Tóth S, Kovács M, Bóta B ve ark. (2020).** Effect of mannan-oligosaccharide (MOS) and inulin supplementation on the performance and certain physiological parameters of calves reared on milk replacer. *J Appl Anim Res*, 48 (1), 228-234.
- Ural K, Gültekin M, Erdoğan H ve ark. (2020).** Kısa dönem değişmeli takvim probiyotik sağaltımıyla atopik dermatitli köpeklerde kaşıntı giderilebilir mi? *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 11 (1), 1-8.
- Uzmay C, Kiliç A, Kaya I ve ark. (2011).** Effect of mannan oligosaccharide addition to whole milk on growth and health of Holstein calves. *Arch Anim Breed*, 54 (2), 127-136.
- Ülger İ (2019).** Effects of pre-weaning probiotic treatments on growth performance and biochemical blood parameters of Holstein calves. *Indian J Anim Res*, 53 (5), 644-647.
- Windschitl PM (1991).** Effect of probiotic supplementation on growth rate, rumen metabolism, and nutrient digestibility in holstein heifer calves. *Asian-Australas J Anim Sci*, 4 (4), 341-351.
- Wu Y, Wang L, Luo R ve ark. (2021).** Effect of a multispecies probiotic mixture on the growth and incidence of diarrhea, immune function, and fecal microbiota of pre-weaning dairy calves. *Front Microbio*, 12, 681014.
- Zábranský L, Poborská A, Malá G ve ark. (2021).** Probiotic and prebiotic feed additives in calf nutrition. *J Cent Eur Agric*, 22 (1), 14-18.



Effects of Nano Selenium on Some Metabolic and Rumen Parameters in Dorper Sheep

Duygu BUDAK*^{ORCID}

Aksaray University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Animal Nutrition and Nutritional Disease, 68100, Aksaray, Türkiye

Received: 12.12.2023

Accepted: 16.02.2024

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the effects of nano selenium (N-Se) supplementation on some metabolic parameters and rumen fermentation in sheep. In the study, twenty female Dorper sheep, average 60.1 ± 0.44 kg of body weight were used and blood samples and rumen fluid were taken at the end of trial. The animals were randomly divided into two trial groups (n=10). The control animals received the basal ration without Se supplementation, containing a native Se content of 0.06 mg/kg DM. The other sheep were fed the same basal ration supplemented with 3 g/head/day N-Se. Trial were 66 days with 10 days of adaptation to feed and 56 days of feeding period. Serum total protein (p=0.514) and albumin (p=0.126) levels did not change by feeding N-Se. Serum T-cholesterol, triglycerides, AST (p=0.001) and ALT (p=0.030) levels were decreased in the N-Se-treated group when compared with the control. Supplementation of N-Se did not effect ruminal pH values (p=0.792), the molar concentration of acetic acid (p=0.133) and butyric acid (p=0.089), but the ammonia concentration (p=0.001) was decreased, and total VFA concentration (p=0.003) was increased. The ratio of acetate to propionate decreased due to the increasing of propionate concentration (p=0.034). The obtained results indicated that N-Se supplementation positively improved ruminal fermentation and metabolic status. It was concluded that N-Se can be used as an alternatively available selenium source in sheep.

Keywords: Dorper sheep, Nanomineral, Nano selenium, Rumen.

ÖZ

Dorper Koyunlarında Bazı Metabolik ve Rumen Parametreleri Üzerine Nano Selenyumun Etkileri

Çalışmanın amacı koyunlarda nano selenyum (N-Se) ilavesinin bazı metabolik parametreler ve rumen fermantasyonu üzerindeki etkilerini araştırmaktır. Çalışmada canlı ağırlıkları ortalama 60.1 ± 0.44 kg olan 20 adet dişi Dorper koyunu ve bu koyunlardan deneme sonunda alınan kan örnekleri ve rumen sıvısı kullanıldı. Hayvanlar rastgele iki deneme grubuna (n=10) ayrıldı. Kontrol hayvanları, Se takviyesi olmadan, 0,06 mg/kg DM'lik doğal Se içeriği içeren temel rasyonla, diğer koyunlar, 3 g/baş/gün N-Se ilaveli temel rasyonla beslendi. Deneme, 10 gün yeme adaptasyon ve 56 gün besi dönemi olmak üzere 66 gün sürdürüldü. Serum toplam protein (p=0.514) ve albümin (p=0.126) düzeyleri N-Se takviyesiyle değişmedi. Serum T-kolesterol, trigliseritler, AST (p=0.001) ve ALT (p=0.030) seviyeleri, N-Se ilave edilen grupta kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azaldı. N-Se ilavesi ruminal pH değerlerini (p=0.792), asetik asit (p=0.133) ve bütirik asidin molar konsantrasyonunu (p=0.089) etkilemezken, amonyak konsantrasyonu (p=0.001) azaldı ve toplam VFA konsantrasyonu (p=0.003) arttı. Asetatın propiyonata oranı, propiyonat konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak azaldı (p=0.034). Elde edilen sonuçlar, N-Se takviyesinin rumen fermantasyonunu ve metabolik durumu olumlu yönde iyileştirdiğini gösterdi. N-Se'nin koyunlarda alternatif bir selenyum kaynağı olarak kullanılabilmesi sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Dorper koyunu, Nanomineral, Nano selenyum, Rumen.

INTRODUCTION

Recently, nanominerals have been used especially as feed supplementation to have several benefits on health and to fulfill livestock from the mineral requirements. Researchers try to insert nanominerals using their benefits to aim towards the better health, nutrition and performance of animals. So far, researches have shown

that the practise of nanominerals in the immunity, production, and reproduction is promising (Amini and Pirhajati 2018; Osama et al. 2020; Abdelnour et al. 2021; Delir et al. 2022). The nanoparticle form of minerals is to induce changes in the main material's fundamental physical and chemical structure (Singh and Prasad 2017). These are stated to be use the features of quite small



doses, better bioavailability in metabolism, absorption, and stable connect with other compounds (Abd El-Hack et al. 2017; Uniyal et al. 2017). Nanominerals can act as functional into the animal body by increasing the surface area with biological connect, allowing nutritional compounds to remain in the gastrointestinal tract longer, permeating deeply into the mucosal area. They can enable to fast transportation of nutritional compounds to target tissue and organs (Fesseha et al. 2020; Reddy et al. 2020). So they minimize feces excretion, and can also be used as reducers of environmental pollution (Abdelnour et al. 2021).

The vital trace element selenium is required for diverse physiological and biological processes, especially including skeletal muscles and liver function (Perrone et al. 2016). In addition, selenium is a trace mineral widely used to regulate animal metabolism and some positive effects on rumen fermentation such as total volatile fatty acids (VFA), molar ratio of propionate, acetate-propionate ratio, ruminal ammonia (NH₃-N), pH, and enzymatic activity (Hendawy et al. 2022). In recent years, attention in nano selenium (N-Se), a form of selenium with much smaller particle size, compared to the most common dietary supplements of selenium known organic (selenomethionine, dimethylselenide, selenocystine, S-methylselenocysteine) or inorganic (selenite, selenate, selenide, elemental selenium) forms has been increasing due to its beneficial effects on health and productivity (Chhabria and Desai 2016; Skalickova et al. 2017; Hendawy et al. 2022; Aljaf and Bolshakova 2023). It has higher bioavailability, catalytic activity, absorption ability, much lower toxicity related to various important characteristics such as particule size, different shape, chemical structure, and surface charge (Hosnedlova et al. 2018; Badgar and Prokisch 2020). Se nanoparticles as an immunostimulator have fascinated great attention due to their unique antimicrobial-antiviral-antioxidant activity, remarkable anticancer activity, in prevention of induced reproductive toxicity and metabolic disorders (Hosnedlova et al. 2018). Studies have been demonstrated on the impact of utilizing N-Se on blood parameters, immune system, renal and liver functions, and liver enzyme levels (Mahmoud et al. 2016; Qin et al. 2016; Surai and Kochish 2020; Bolshakova and Aljaf 2022;). According to the studies, N-Se may help in lowering the levels of liver enzymes like aspartate- aminotransferase (AST) and alanine-aminotransferase (ALT), which are signs of liver damage by increasing the activity of antioxidant enzymes (Shi et al. 2011b; Versteegen and Günther 2023). Moreover, it has been stated that N-Se possesses anti-inflammatory properties, which may aid minimize liver inflammation and improve liver function (Abdou and Sayed 2019; Aljaf and Bolshakova 2023). Supplementing with N-Se may also help to improve lipid profile in terms of cholesterol and triglycerides that could increase the risk of cardiovascular disease when their levels are high (Safdari-Rostamabad et al. 2017). It has been expressed that N-Se has antioxidant activity that may aid in the prevention of lipid peroxidation (Qin et al. 2016). Furthermore, according to Safdari-Rostamabad et al. (2017) N-Se effects the expression of genes associated with lipid metabolism, which may increase the lipid-lowering role of the matter. Information about the effects of N-Se on protein metabolism is quite limited. It is demonstrated that supplementing with N-Se may improve blood levels of proteins, especially albumin the protein most commonly produced by the liver. Albumin is necessary for moving various substances through the blood, like hormones and

medications. An improvement in liver function and protein metabolism may be demonstrated by an increase in albumin levels after taking N-Se supplements (Aljaf and Bolshakova 2023). Shi et al. (2011b) stated that nano-Se addition fed (0.3 mg/kg body weight for 12 weeks) male goats Se content in blood, serum, and tissues was improved.

However, the metabolic effects of N-Se on liver function and enzyme levels, may differ depending on daily uptake, solubility, length of addition, other dietary components, age and health status. Additionally, it has been emphasized that the degree of effect of N-Se depends on the size, and the bioactivity and toxicity of selenium nanoparticles may be higher at 36 nm compared to 80 nm and above (Skalickova et al. 2017).

In feeding trials in small ruminants, it was stated that N-Se has a positive effect on rumen development, feed evaluation rate and nutrient digestibility (Shi et al. 2011a; Xun et al. 2012; Skalickova et al. 2017). This effect has been associated to their ability to modificate rumen fermentation, especially fiber digestion in ruminant (Badgar and Prokisch 2020). In some studies, on sheep, it has been suggested that the acetic acid profile in the rumen shifts towards propionic acid with nano selenium supplementation (Shi et al. 2011a; Xun et al. 2012). Most of the propionic acid produced and absorbed by fermentation in the rumen is converted to glucose in the liver and used as an energy source. It was reported that ammonia nitrogen concentration decreased with increasing propionic acid and total VFA in sheep fed N-Se, while ruminal pH level was maintained at optimum limits for cellulolytic activity. It is stated that this situation in the rumen may be due to the rapid absorption and high bioavailability of N-Se (Xun et al. 2012).

To completely perceive the mechanisms and used dosages of nano-selenium for the metabolic and ruminal effects, more research is required. The study aimed to evaluate the effect of N-Se on some metabolic and rumen parameters in sheep.

MATERIAL AND METHODS

This study was carried out with the decision of the local ethics committee of animal experiments in Aksaray University with the date 12.09.2023 and number E-60580050-125.04-11124714.

Twenty healthy female Dorper sheep (60.1±0.44 kg body weight) were randomly divided to one of the two experimental groups (n=10). The animals in the control group (CON) were fed the basal ration (including 0.06 mg Se/kg dry matter) without any supplementation. Basal ration contained a Se concentration, which was lower than the level (2-5 mg/kg diet dry matter) daily intake for sheep (NRC 2007). The animals in experimental second group were taken basal ration added with 3 mg/head/day N-Se. The N-Se was weighed every morning using a precision scale and mixed manually on the concentrated feed into the individual feeder. The basal ration included concentrate feed and, third mowed alfalfa hay as roughage material (Table 1). The animals were consumed 1500 g dust form concentrate and 300 g 3-5 cm size chopped alfalfa hay, in separate feeders at 08:00-18:00, daily. This feeding level fulfilled the nutritional requirement of 60 kg body weight sheep (NRC 2007). The animals were hosted in individual compartments (1.5 m x 1.7 m), had unlimited access to clean water throughout the trial. The experiment lasted for 66 days and consisted of lasting 56 experimental

days, including 10 days of adaptation. The concentrate feed was supplied from a commercial feed factory. N-Se (26.80-84.78 nm particle size) biologically synthesized from *Vitis vinefera* (grape) extract was obtained from Bogazici University Department of Chemistry Laboratory (Figure 1).

Procedures suggested by Association of Official Analytical Chemists (AOAC 1997) were used to determine the values of crude nutrient matters. The amounts acid detergent fibre (ADF) and neutral detergent fibre (NDF) in the feeds were determined according to Van Soest (1994). Metabolizable energy (ME) level was determined according to the method proposed by Turkish Standards Institution (TSI 1991) (Table 1).

Table 1: Chemical compositions of concentrate feed and alfalfa hay used in this study.

Chemical composition	Concentrate feed	Alfalfa hay
Dry matter, %	88.73	91.20
Organic matter ^a , %	80.49	83.22
Crude protein, %	13.75	11.29
Crude cellulose, %	10.14	38.12
Ether extract, %	2.37	0.96
Crude ash, %	8.24	7.98
NNE ^b , %	54.23	32.85
ADF, %	22.12	33.25
NDF, %	41.04	61.35
HCL ^c , %	18.92	28.10
Se, mg/kg DM	0.06	-
ME, Mcal/ kg DM	2.57	1.34

^aIt was measured as the difference between dry matter and the crude ash.
^bNon-nitrogen extract (NNE=DM- (CP+CA+EE+CC)). ^cHemicellulose (HCL=NDF-ADF).

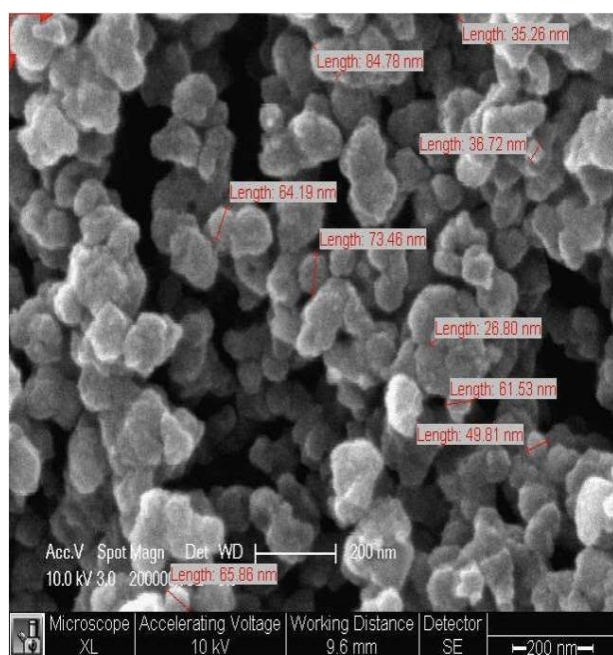


Figure 1: Scanning electron microscopy image of the synthesized N-Se.

The blood samples were taken from the jugular vein of all animals into the hollow tubes (10 mL-Becton Dickinson and Company, New Jersey, USA), without anticoagulant. The samples were collected three hours after the morning feeding on the last day of trial, and they were centrifuged at 3000 rpm/15 min. Afterwards, they were taken to eppendorf tubes and analyzed. Total protein, albumin, total cholesterol (T-cholesterol), triglycerides, AST and ALT levels were determined in serum samples. They were detected using the commercial kits (Randox, UK) and a spectrophotometer (Randox Daytona plus RX 4040, UK) colorimetrically. Selenium (Se) was measured using plasma mass spectrometry (ICP-MS, Thermo-X Series).

At the last day of fattening, samples of rumen liquid were collected by stomach tube at the same time, blood samples was taken from each animal. After the feeding, feeders were emptied, and all animals were obtained to drink clean water. The pH of the rumen fluid was measured immediately by using automatic pH meter (ADWA AD12). Three sample bottles were used for the rumen fluid of each sheep. Later, they were transported in dry ice to the laboratory.

Gas chromatography was used to detect VFA, acetic, propionic and butyric acids. For this, standards were prepared with 10 mmol / L VFA mixture and 1 µl rumen fluid drawn into 10 µl injector were transfused into chromatography apparatus (Shimadzu GC-2010). The samples were centrifuged at 4000 rpm/15 min. The tubes which 1 ml supernatant and 0.2 ml 25% metaphosphoric acid were added, and then were kept on ice for 30 minutes to precipitate the proteins, later centrifuged again.

Concentration of NH₃-N was measured by using indophenol blue method with spectrophotometer. The samples centrifuged at 14000 rpm/15 min, phenol sodium and ammonia were oxidised in sodium nitroprusside. An intense blue color was created, indicating NH₃-N concentration.

Statistical Analysis

Data were summarized as mean±standard error of mean (SEM) for continuous variables, frequencies (percentiles) for categorical variables. Student's t test or Mann Whitney U test was used for independent group comparisons, depending on the distributional properties of the data (Shapiro Wilk and Kolmogorov Smirnov tests were applied according to groups). Chi-square test was used for proportions and its counterpart Fisher's Exact test was used when the data were sparse. All analyses were performed IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

RESULTS

Table 2 showed the effect of N-Se indicates no significant effect on serum total protein (p=0.514) and albumin (p=0.126) levels. The level of serum T-cholesterol showed a significant decrease from 52.19 to 47.46 mg/dL in the N-Se-treated group when compared with the CON (p=0.001). Additionally, the levels of serum triglycerides were also decreased from 33.34 to 31.01mg/dL (p=0.001). So, it was observed that the lipid profile was decreased using N-Se. The effect of N-Se showed significant alteration in the liver enzymes; the level of serum AST (p=0.001) and ALT (p=0.030) levels were decreased significantly in the N-Se group compared to CON.

Table 2: Effects of N-Se supplementation on metabolic parameters in sheep.

Item	Treatments ¹		SEM ²	p values ³
	CON	N-Se		
Total protein, (g/dL)	5.814	6.136	0.186	0.514
Albumin, (g/dL)	2.982	2.958	0.031	0.126
T-cholesterol, (mg/dL)	52.19	47.46	2.911	0.001
Triglycerides, (mg/dL)	33.34	31.01	2.762	0.001
AST, (IU/L)	124.41	119.11	4.838	0.001
ALT, (IU/L)	18.49	17.09	1.072	0.030

¹Control (CON) sheep were fed a basal diet; N-Se sheep were fed the same basal diet supplemented with nano selenium (N-Se). ²SEM: Standard error of mean. ³P values: p<0.05 was considered as statistically significant.

The ruminal pH, NH₃-N and VFA are listed in Table 3. Supplementation of N-Se did not affect ruminal pH values (p=0.792), but the ammonia levels from 10.64 to 8.25 mmol/L (p=0.001), while total VFA levels increased from 60.45 to 65.35 mmol/L (p=0.003). The molar concentrations of propionic acid (p=0.017) were increased by N-Se supplementation. The molar concentration of acetic acid (p=0.133) and butyric acid (p=0.089) was similar between the two groups. Ratio of acetate to propionate was decreased with N-Se supplementation (p=0.034).

Table 3. Effects of N-Se supplementation on rumen parameters in sheep.

Item	Treatments ¹		SEM	p values
	CON	N-Se		
Ruminal pH	6.75	6.73	0.04	0.792
NH ₃ -N, mmol/L	11.25	9.64	0.40	0.001
Total VFA, mmol/L	60.45	65.35	1.74	0.003
VFA, mol/100 mol				
Acetic acid	54.86	55.54	1.69	0.133
Propionic acid	24.37	27.17	0.43	0.017
Butyric acid	10.96	11.08	0.82	0.089
A: P ²	2.25	2.04	0.05	0.034

¹Control (CON) sheep were fed a basal diet; N-Se sheep were fed the same basal diet supplemented with nano selenium (N-Se). ²A:P; Acetic acid: propionic acid. ³SEM: Standard error of mean. ³P values: p<0.05 was considered as statistically significant.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Metabolic Parameters

Blood metabolites may be beneficial in reporting animal health status, may aid in the identification of various metabolic disorders and, these are important indicators for the metabolic activity (Halawa et al. 2023).

Serum total protein levels were quantitatively higher with N-Se supplementation, but this was insignificant. Being supplemented with 3 mg/kg/day N-Se had no appreciable impact on the serum total protein and albumin levels,

which agreed with other some studies (Najaf Nejad et al. 2016; Salam et al. 2021; Bolshakova and Aljaf 2022). These results also agreed with Halawa et al. (2023), who showed an unaffacting in serum total protein and albumin, on Ossimi ewes supplementing with 1 mg/kg BW/day N-Se during post-partum. Albumin is a plasma protein with the highest level of concentration and moves various substances in the body (Bolshakova and Aljaf 2022). According to Aljaf and Bolshakova (2023), the drop in albumin level raise the possibility that taking N-Se supplements might affect how proteins are metabolized. On the other hand, Mahmoud et al. (2013) associated the significant increases in serum total protein to the improvement in protein anabolism and reduction of protein catabolism with Se.

In this study, the levels of serum T-cholesterol and triglycerides were decrease with N-Se supplementation. Drop in total cholesterol and triglycerides may indicate the positive role of N-Se on lipid profile and energy metabolism (Ibrahim and Mohamed 2018). Physiological status of animal may also affect to the levels of triglycerides and total cholesterol, and lower their levels are related with an increased energy requirement (Halawa et al. 2023). Halawa et al. (2023) indicated that the triglycerides in N-Se supplemented group showed fluctuated levels on ewes during postpartum periods characterized by significant decrease at day 45 and increase at day 60 of postpartum. The findings of this investigation agreed with those of some other studies regarding the serum T-cholesterol level of N-Se (Bolshakova and Aljaf 2022). However, unlike this study, according to Bolshakova and Aljaf (2022), triglycerides showed no significantly changed in the 0.5 mg/kg N-Se fed lambs. In addition, according to some reports, the amount of organic or inorganic Se supplementation had no appreciable impact on the serum cholesterol and triglycerides of sheep (Novoselec et al. 2022).

AST and ALT levels were significantly reduced on Dorper sheep supplementing with N-Se compared to the CON. These results disagreed with Qin et al. (2016), who showed an raising in ALT, but decreasing AST levels by using N-Se. However, it was consistent with the research results of Halawa et al. (2023), who reported that AST and ALT decreased in the N-Se group. According to Aljaf and Bolshakova (2023), the drop in AST level may be a sign that liver function has possibly improved. It is stated that also dairy cows' serum AST activity were significantly decreased by 3 ppm N-Se administration (Najaf Nejad et al. 2016). Salam et al. (2021), in a study using N-Se supplementation at 0.1 and 0.2 mg/kg levels in sheep diets, emphasized that serum AST levels may also raise as the amount of N-Se in the diet increases. So, results of this study indicate that the dosage and particule size of the N-Se utilized had no impact on female Dorper sheep liver tissue damage, and positively affected liver function.

In addition, Ibrahim and Mohamed (2018) concluded that dietary supplementation of 0.30 mg/kg DM N-Se was more effective than organic and inorganic sources of Se to improve feeding values and some serum metabolic indices of male lambs. Similarly, Khalil et al. (2023) reported that fed the 1.2 mg/kg DM N-Se was more effective than inorganic form as sodium selenite in improving the productive performance of both ewes and their lambs, but did not affect total protein, albumin, triglycerides, cholesterol, AST and ALT levels (except Se concentrations) compared to the control group. According to the researchers, because of increases in the activity of serum antioxidant enzyme and blood Se concentration of ewes

fed N-Se compared to the control may confirm the bioavailability of N-Se is higher than inorganic Se. Mousaie et al. (2014) also reported improvements in the general health status and of sheep fed N-Se more than 1 mg/kg DM without adverse effects on the blood metabolites.

Rumen Parameters

In this study, the ruminal pH values (pH 6.75–6.73) were within the normal range for healthy rumen function, because this value lower than 5.5 or higher than 7.0 are accepted abnormal (Hosnedlova et al. 2018). Ruminal pH within optimum limits is an important indicator for cellulolytic bacterial activity (Shi et al. 2011a).

Overall, VFAs from carbohydrates account for approximately 70% of the total energy absorbed by ruminants, therefore, VFA concentrations are important fermentation signaling mechanism in ruminants (Tian et al. 2022). According to Tian et al. (2022); the observed increase in total VFA is likely related to N-Se increasing the relative abundance of rumen microorganisms that primarily degrade carbohydrates, and more propionate is required to provide energy for ruminants. In this study, supplementation with N-Se modified the rumen fermentation in terms of ammonia and total VFA. It was determined that while the NH₃-N concentration decreased, the total VFA concentration increased. It may be related to increased propionate concentration. These positive effects on rumen fermentation could be related to the improved absorption bioavailability, the raised surface area/volume ratio, nano-size, fast and specific action, and catalytic effectiveness (Adegbeye et al. 2019). Similar to these results, Shi et al. (2011a) (0.3, 3 and 6 g elemental N-Se/kg DM instead of non-supplemented basal diet) and Xun et al. (2012) (4 g nano-Se/kg DM instead of Se-yeast) reported that N-Se addition significantly decreased NH₃-N concentration, and total VFA concentration increased. In contrast to the findings of this study, Xun et al. (2012) also found that ruminal pH and molar concentration of propionic acid were significantly reduced. Shi et al. (2011a), confirmed that growing rumen microbial population by N-Se addition would increase the NH₃-N utilization. They also reported that, this was connected with urinary purine involutions which were increased with N-Se addition. N-Se supplementation in Dorper sheep modified rumen fermentation template by shifting to propionic acid, and the increased molar propionic acid ratio resulted in the reduction in the ratio of acetic acid to propionic acid. This finding is consistent with the result of Shi et al. (2011a) who emphasized that this rate was decreased with increasing N-Se addition in sheep.

In addition, in a study conducted on lactating goats reported that similarly with this study's results, oral administration of organic Se with vitamin E (100 mg/goat/day) supported positively the rumen fermentation, enhanced total VFA production especially propionic acid, and reduced NH₃-N concentration compared to the control (Morsy et al. 2019).

In conclusion, in the present study, dietary N-Se supplementation (3 mg/kg DM) effectively reduced serum T-cholesterol, triglycerides, AST and ALT levels in Dorper sheep. It maintained ruminal pH at optimum levels, decreased ammonia nitrogen. These effects were probably due to modifications in the total VFA profile in response to N-Se. In conclusion, the results of the current study indicated that the N-Se supplementation was not only found to positively affect metabolic profile (in terms of T-cholesterol, triglycerides, AST and ALT) both also provide modification on some rumen fermentation parameters.

Further investigation is needed to study the mode of action of N-Se supplemented with various particule size and usage doses on blood metabolites and rumen parameters.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

I would like to thank Assoc. Prof. Dr. Oktay Demircan and Boğaziçi University Chemistry Department Laboratory for biologically synthesizing N-Se used as experimental material.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: DB
Supervision / Consultancy: DB
Data Collection and / or Processing: DB
Analysis and / or Interpretation: DB
Writing the Article: DB
Critical Review: DB

REFERENCES

- Abd El-Hack M, Alagawany M, Farag M et al. (2017). Nutritional and pharmaceutical applications of nanotechnology: Trends and advances. *Int J Pharmacol*, 13, 340–350.
- Abdelnour SA, Alagawany M, Hashem NM et al. (2021). Nanominerals: fabrication methods, benefits and hazards, and their applications in ruminants with special reference to selenium and zinc nanoparticles. *Animals*, 11 (7), 1916.
- Abdou RH, Sayed N (2019). Antioxidant and anti-inflammatory effects of nano-selenium against cypermethrin-induced liver toxicity. *Cell Bio*, 8 (4), 53–65.
- Adegbeye MJ, Elghandour MMMY, Barbabosa-Pliego A et al. (2019). Nanoparticles in equine nutrition: Mechanism of action and application as feed additives. *J Equine Vet Sci*, 78, 29–37.
- Aljaf KA, Bolshakova MN (2023). Nano-selenium-mediated alterations in lipid profile, liver and renal functions, and protein parameters in male lambs: An experimental study. *RUDN J Agron Anim Ind*, 18 (2), 230–240.
- Amini SM, Pirhajati MV (2018). Selenium nanoparticle's role in organ systems functionality and disorder. *Nanomed Res J*, 3, 117–124.
- AOAC (1997). Official methods of analysis. Association of official analytical chemists. Gaithersburg, MD.
- Badgar K, Prokisch J (2020). The effects of selenium nanoparticles (SeNPs) on ruminant. *PMAS*, 60 (4), 236.
- Bolshakova M, Aljaf KAH (2022). The effect of dietary nano-selenium and cannabis seeds on liver tissues and functions in male Karadi lambs. *J Pharm Negat Results*, 13 (5), 1051–1057.
- Chhabria S, Desai K (2016). Selenium nanoparticles and their applications. *ENN*, 20, 1–32.
- Delir S, Taghizadeh A, Paya H, Palangi V (2022). Application of nanomaterials in animal sciences. *Nano Era*, 2 (1), 19–22.
- Fesseha H, Degu T, Getachew Y (2020). Nanotechnology and its application in animal production: A review. *Vet Med Open J*, 52, 43–50.
- Halawa EH, Imbabi TA, Farid OAA, Radwan AA, El-Sayed AIM (2023). The influence of selenium nanoparticles and L-Carnitine on various biochemical markers and oxidative stress status in Ossimi ewes during post-partum periods. *BVMJ*, 44 (1), 34–38.
- Hendawy AO, Sugimura S, Sato K et al. (2022). Effects of selenium supplementation on rumen microbiota, rumen fermentation, and apparent nutrient digestibility of ruminant animals: A review. *Fermentation*, 8, 4.
- Hosnedlova B, Kepinska M, Skalickova S et al. (2018). Nano-selenium and its nanomedicine applications: A critical review. *Int J Nanomedicine*, 13, 2107–2128.
- Ibrahim EM, Mohamed MY (2018). Effect of different dietary selenium sources supplementation on nutrient digestibility, productive performance and some serum biochemical indices in sheep. *EJNF*, 21 (1), 53–64.
- Qin F, Chen F, Zhao FH, Jin TM, Ma J (2016). Effects of nanoselenium on blood biochemistry, liver antioxidant activity and GPx-1 mRNA

- expression in rabbits. In: Proceedings of the 2016 International Conference on Biomedical and Biological Engineering (pp. 166-171). Atlantis Press, China.
- Khalil MMH, Soltan YA, Khadiga GA et al. (2023).** Comparison of dietary supplementation of sodium selenite and bio-nanostructured selenium on nutrient digestibility, blood metabolites, antioxidant status, milk production, and lamb performance of Barki ewes. *Anim Feed Sci Technol*, 297, 115592.
- Mahmoud HED, Ijiri D, Ebeid TA, Ohtsuka A (2016).** Effects of dietary nano-selenium supplementation on growth performance, antioxidative status, and immunity in broiler chickens under thermoneutral and high ambient temperature conditions. *J Poult Sci*, 53 (4), 274-283.
- Mahmoud GB, Abdel-Raheem MS, Hussein HA (2013).** Effect of combination of vitamin E and selenium injections on reproductive performance and blood parameters of Ossimi rams. *Small Rumin*, 13 (1), 103-108.
- Morsy AS, El-Zaiat HM, Saber AM, Anwer MM, Sallam SM (2019).** Impact of organic selenium and vitamin E on rumen fermentation, milk production, feed digestibility, blood parameters and parasitic response of lactating goats. *J Agr Sci Tech*, 21, 1793-1806.
- Mousaie A, Valizadeh R, Naserian AA, Heidarpour M, Kazemi Mehrjerdi H (2014).** Impacts of feeding selenium-methionine and chromium-methionine on performance, serum components, antioxidant status and physiological responses to transportation stress of Baluchi ewe lambs. *Biol Trace Elem Res*, 162, 113-123.
- Najaf Nejad B, Ali Arabi H, Tabatabaee MM et al. (2016).** Effects of different sources of selenium on some hematological parameters and antioxidant response in Holstein dairy cows. *J Anim Sci Res*, 26 (2), 45-57.
- Novoselec J, Klir Šalavardić Ž, Đidara M et al. (2022).** The effect of maternal dietary selenium supplementation on blood antioxidant and metabolic status of ewes and their lambs. *Antioxidants*, 11 (9), 1664.
- NRC (2007).** Nutrient requirements of small ruminants. Animal Nutrition Series. National Research Council. Washington. D.C.
- Osama E, El-Sheikh Sawsan MA, Khairy MH, Galal Azza AA (2020).** Nanoparticles and their potential applications in veterinary medicine. *J Adv Vet Res*, 10, 268-273.
- Perrone D, Monteiro M, Nunes JC (2016).** Selenium: Chemistry, analysis, function and effects. Victor R Preedy (Ed). Food and Nutritional Components in Focus, 9, 3-15.
- Reddy PRK, Yasaswini D, Reddy PPR et al. (2020).** Applications, challenges, and strategies in the use of nanoparticles as feed additives in equine nutrition. *Vet World*, 13, 1685-1696.
- Safdari-Rostamabad M, Hosseini-Vashan SJ, Perai AH, Sarir H (2017).** Nanoselenium supplementation of heat-stressed broilers: effects on performance, carcass characteristics, blood metabolites, immune response, antioxidant status, and jejunal morphology. *Biol Trace Elem Res*, 178, 105-116.
- Salam AY, El-Shamaa IS, Metwally AM et al. (2021).** Effect of selenium administration on reproductive outcome and biochemical parameters to ewes and their lambs. *J Anim Poult*, 12 (12), 379-386.
- Shi L, Xun W, Yue W et al. (2011a).** Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Anim Feed Sci Technol*, 163, 136-142.
- Shi L, Xun W, Yue W et al. (2011b).** Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. *Small Rumin*, 96, 49-52.
- Singh A, Prasad SM (2017).** Nanotechnology and its role in agro-ecosystem: A strategic perspective. *Int J Environ Sci Technol*, 14, 2277-2300.
- Skalickova S, Milosavljevic V, Cihalova K et al. (2017).** Selenium nanoparticles as a nutritional supplement. *Nutrition*, 33, 83-90.
- Surai PF, Kochish II (2020).** Food for thought: nano-selenium in poultry nutrition and health. *Anim Health Res Rev*, 21 (2), 103-107.
- Tian X, Wang X, Li J et al. (2022).** The effects of selenium on rumen fermentation parameters and microbial metagenome in goats. *Fermentation*, 8, 240.
- TSI (1991).** Animal feeds-determination of metabolizable energy (chemical method) TS9610, Turkish Standards Institution, Turkey, 2-3.
- Uniyal S, Dutta N, Raza M et al. (2017).** Application of nano minerals in the field of animal nutrition: A review sandeep. *BEPLS*, 6 (4), 4-8.
- Van Soest PJ (1994).** Fiber and physicochemical properties of feeds in: nutritional ecology of the ruminant (pp. 140-155). Cornell University Press, New York.
- Verstegen J, Gunther K (2023).** Biosynthesis of nano selenium in plants. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 51 (1), 13-21.
- Xun W, Shi L, Yue W et al. (2012).** Effect of high-dose nano-selenium and selenium-yeast on feed digestibility, rumen fermentation, and purine derivatives in sheep. *Biol Trace Elem Res*, 150 (1-3), 130-136.



Süt İneklerinde Meme Başı Kanalının Ultrasonografik Değerlendirilmesi

Mehmet YILDIZ^{1,*} Sait ŞENDAĞ¹

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, 65040, Van, Türkiye

Geliş Tarihi: 04.01.2024

Kabul Tarihi: 14.03.2024

ÖZ

Ultrasonografi sığırlarda meme ve meme başlarının incelenmesinde kullanılabilecek noninvazif bir tekniktir. Bu çalışmanın amacı meme başı kanalı olarak bilinen duktus papillaris (Dp) uzunluğunun ırk, parite, mastitis, gebelik ve sağım şekli gibi bazı maternal faktörlerle ilişkisini araştırmaktır. Çalışmanın hayvan materyalini farklı ırk (Holstein, Simmental, Montofon) ve yaşta, klinik olarak sağlıklı toplam 50 inek oluşturdu. Bu kapsamda ineklerde ırk, parite, mastitis, gebelik ve sağım şekli verileri ultrasonografik ölçümler eşliğinde değerlendirildi. Elle sağım ile tüm meme başlarında sağımın kolaylığı veya zorluğu tecrübesi olan aynı kişi tarafından test edildi. Memenin genel klinik muayenesi ve temizliği yapıldıktan sonra Dp uzunlukları ultrasonografi (5-7.5 MHz lineer prob) ile ölçülerek kaydedildi. Sonuç olarak, tüm hayvanlarda ortalama Dp uzunluklarının ön meme başlarında 9.80 ± 2.08 mm (sağ) ve 9.90 ± 2.03 mm (sol) ve arka meme başlarında 10.22 ± 1.91 mm (sağ) ve 10.29 ± 1.92 mm (sol) mm olduğunu tespit edildi. Meme başlarındaki Dp uzunluklarında istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Ayrıca Dp ile ırk, parite, mastitis, gebelik ve sağımın kolaylığı veya zorluğu arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p > 0.05$).

Anahtar Kelimeler: Ductus papillaris, Meme bezi, Sığır, Ultrasonografi.

ABSTRACT

Ultrasonographic Evaluation of the Teat Canal in Dairy Cows

Ultrasonography is a noninvasive technique that can be used to examine the udder and teats in cattle. The aim of this study is to investigate the relationship between the length of the ductus papillaris (Dp), known as the teat canal, and some maternal factors such as race, parity, mastitis, pregnancy and milking method. The animal material of the study consisted of a total of 50 clinically healthy cows of different breeds (Holstein, Simmental, Montofon) and ages. Within this scope, data on breeds, parity, mastitis, pregnancy, and milking method were evaluated. All teats were tested by the same person who had experience with the ease or difficulty of hand milking. After a general clinical examination and cleaning of the udder, Dp lengths were measured and recorded using ultrasonography (5-7.5 MHz linear probe). As a result, the average Dp lengths in all animals were determined to be 9.80 ± 2.08 mm (right) and 9.90 ± 2.03 mm (left) in the front teats, and 10.22 ± 1.91 mm (right) and 10.29 ± 1.92 mm (left) in the rear teats. There was no statistically significant difference between Dp lengths at the teat ends ($p > 0.05$). Furthermore, significant difference was not found between Dp and breed, parity, mastitis status, pregnancy and ease or difficulty of milking ($p > 0.05$).

Keywords: Cow, Ductus papillaris, Teat gland, Ultrasonography.

GİRİŞ

Son yıllarda mastitis kontrol programlarının yaygın kullanılmasına ve araştırmalara rağmen mastitis, hala dünya çapında süt ineklerinin en yaygın ve maliyetli hastalığı olarak kabul edilmektedir (Ruegg ve Petersson-Wolfe 2018). Mastitise bağlı tahmin edilen ekonomik kayıp, yıllık gelirin %5-7'si kadardır (Mekonnen ve ark. 2019; Tóth ve ark. 2023). Ekonomik kaybın %70'i ise mastitis nedeniyle süt verimindeki düşüşten kaynaklanmaktadır (Özyurtlu 2011). Mastitisin işgücü ve tedavi masrafları, düşük laktasyon, erken kesime gitme, süt miktarı ve kalitesi üzerinde olumsuz etkisi vardır

(Cheng ve Han 2020). Ductus papillaris (Dp) yoluyla meme bezine giren patojen bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar mastitisin en yaygın nedeni olduğundan, Dp ve çevre dokularının bütünlüğünün sürdürülmesi enfeksiyona karşı direnç açısından kritik öneme sahiptir (Mein 2012). Ayrıca mastitis oluşumunda süt kanalı yoluyla bulaşmanın rolü oldukça büyüktür. Özellikle süt kanalıyla bulaşmada Dp enfeksiyöz ajanların meme dokusuna girişini engelleyen savunma sistemine sahiptir. Çünkü Dp meme ile dış ortam arasındaki bağlantıyı sağlayan bariyer görevi üstlenmektedir.



Dolayısıyla Dp patojen mikroorganizmalara karşı ilk doğal savunma bariyerini oluşturmaktadır. Ayrıca yapısında bulunan keratin ve farklı mekanik özellikler ciddi şekilde koruyucu rol oynamaktadır (Davidov ve ark. 2011; Zigo ve ark. 2021).

Ultrasonografi sığırlarda meme, meme başı ve kanallarının incelenmesinde ve görüntülenmesinde kullanılabilen non-invazif bir yöntemdir (Şendağ ve Dinç 1999). Kanal uzunluğu günümüzde net olarak ortaya konulmasına rağmen bu uzunluğu etkileyen maternal faktörler hakkında oldukça sınırlı bilgiler bulunmaktadır (Paulrud 2005; Melvin ve ark. 2019). Ayrıca kanal uzunluğunun doğuma, ırk ve laktasyonun dönemine bağlı olarak değişebileceği ifade edilmektedir (McDonald 1973). Dp ne kadar küçük olursa, memenin enfeksiyon riskinin de o derece fazla olacağı bildirilmektedir (Grindal ve ark. 1991).

Kanal uzunluğunun net olarak ortaya konulmasına rağmen uzunlukta görülen farklılıkların nedenleri tam olarak açıklanmamıştır. Sunulan bu çalışmanın amacı; farklı inek ırklarında, parite, mastitis, gebelik ve sağım şekli ile Dp uzunluğu arasında herhangi bir ilişkinin olup olmadığı ve Dp uzunluğunun pratikte mastitis riski açısından önemini araştırmaktır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Onay tarih ve numarası: 05/05/2016 ve 2016/04).

Çalışma hayvan materyalini, farklı ırk ve yaşlardaki (5.38±1.5) 50 baş süt ineği oluşturdu. Öncelikle bu hayvanlara ait, anamnez bilgileri hasta sahibinden alındı. Bu kapsamda hayvanın ırkı, paritesi, mastitis, gebelik ve sağım şekli gibi bilgiler kaydedildi. Klinik mastitis olan hayvanlar çalışmaya alınmadı. CMT uygulanarak subklinik mastitis teşhis edilen hayvanlar ise mastitis grubuna dahil edildi. Sonrasında, aynı kişi tarafından sağımın nasıl olduğu (zor veya kolay) tespit edildi. Daha sonra memenin genel temizliği yapılarak, her meme başında Dp'lerin ultrason ile ve uzunluk ölçümleri yapıldı (Şekil 1).

Ölçümler Şendağ ve Dinç'in (1999) tanımladığı yöntemlere göre gerçekleştirildi. Meme başlarının ultrasonografik muayeneleri için 5-7.5 MHz linear proba sahip real-time ultrason cihazı (Honda HS-1500) kullanıldı.



Şekil 1: Meme başı kanalına ait ultrasonografi.

Figure 1: Ultrasonography of the teat canal.

İstatistiksel Analiz

Sürekli değişkenler için tanımlayıcı istatistikler, Ortalama±standart sapma değerler tercih edilmiştir. Sürekli değişkenler için grup sayısı iki parametreden oluşan grupların karşılaştırılmasında "Bağımsız örneklem t-testi", ikiden fazla ise karşılaştırmada "Tek Yönlü Varyans Analizi" kullanılmıştır. Varyans analizini takiben, farklı grupları belirlemede "Duncan Çoklu Karşılaştırma Testine" başvurulmuştur. Hesaplamalarda istatistik anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (ver: 20) istatistik programı kullanılmıştır.

BULGULAR

Ductus papillarisin ultrasonografisi hiperekojen linear bir çizgi şeklinde belirlendi. Yapılan ölçümlerde, ortalama Dp uzunluklarının ön meme başlarında 9.80± 2.08 mm (sağ) ve 9.90±2.03 mm (sol), arka meme başlarında ise 10.22 ± 1.91 mm (sağ) ve 10.29 ± 1.92 (sol) mm olduğu saptandı. Dp uzunluklarının toplamda sağ ön, sağ arka, sol ön ve sol arka uzunlukları arasında farklılıkları istatistiksel açıdan önemsizdi (p>0.05).

Elde edilen Dp'uzunlukları ve hayvanlara ait ırk (Holstein, Montofon ve Simental), parite (1, 2, 3 ve 4), mastitis (mastitis var, mastitis yok), gebelik durumu (gebe, gebe değil) ve sağım şekli (elle sağım, makinalı sağım) arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi (p>0.05) (Tablo 1).

Tablo 1: Duktus papillaris uzunluklarının çeşitli parametreler üzerine etkisi.

Table 1: Effect of ductus papillaris lengths on various parameters.

	Parametreler	N	Duktus Papillaris Uzunlukları			
			Sağ ön (Ort±Ss)	Sağ arka (Ort±Ss)	Sol ön (Ort±Ss)	Sol arka (Ort±Ss)
İrk	Holstein	4	10.00±1.06	8.60±1.48	9.05±1.68	9.53±0.53
	Montofon	18	10.12±1.71	10.10±2.00	9.97±1.85	9.87±1.54
	Simental	28	9.57±2.40	10.53±1.83	9.96±2.21	10.71±2.21
	p		0.679	0.158	0.693	0.254
Parite	1	8	8.96±3.05	10.93±1.71	9.70±1.35	11.30±1.93
	2	14	9.67±1.99	9.71±1.89	9.64±2.32	9.69±1.31
	3	12	9.70±2.29	10.09±2.17	10.19±2.40	10.55±2.87
	4	16	10.40±1.33	10.40±1.8	9.99±1.88	10.19±1.51
	p		0.458	0.519	0.911	0.293

Tablo 1 (devamı): Duktus papillaris uzunluklarının çeşitli parametreler üzerine etkisi.**Table 1 (continued):** Effect of ductus papillaris lengths on various parameters.

Mastitis	Mastitis yok	47	9.88±1.98	10.28±1.86	9.97±2.02	10.35±1.89
	Mastitis var	3	8.50±3.64	9.27±2.81	8.80±2.23	9.63±2.85
	p		0.269	0.377	0.339	0.537
Gebelik	Gebe değil	23	9.61±2.41	10.63±2.18	9.98±2.19	10.32±2.11
	Gebe	27	9.96±1.79	9.87±1.61	9.83±1.92	10.30±1.80
	p		0.554	0.165	0.789	0.964
Sağım Şekli	Elle	42	9.93±2.04	10.16±2.01	9.92±2.12	10.09±1.83
	Makinalı	8	9.10±2.29	10.53±1.33	9.79±1.57	11.42±2.18
	p		0.304	0.629	0.869	0.073

İrk ve parite parametrelerinin istatistiğinde ANOVA, mastitis, gebelik ve sağım şekline ait parametrelerin istatistiğinde Bağımsız örneklem t-testi kullanılmıştır. Ort: Ortalama, Ss: Standart Sapma.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Meme sağlığında öncelik, meme bezi kanal sistemi giriş kapısını oluşturan Dp olmalıdır. Çünkü hem çevresel hem de kontajiyöz patojenler, laktojen bulaşmada temel olarak bu yolu kullanmaktadırlar. Dolayısıyla Dp, mastitisin önlenmesinde önemli bir yapı olarak karşımıza çıkmaktadır (Lacy-Hulbert ve Hillerton 1995; Seyfried 1997; Martin ve ark. 2018). Dp, yaklaşık 10 mm uzunlukta olmasına rağmen, yarım asırdan fazla bir süredir araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Ancak böyle bir birikime rağmen, Dp birçok yönüyle hala araştırmalara açık kapı barındırmaktadır.

Dp'in uzunluğu günümüzde net olarak ortaya konulmuştur. Birçok literatürde bu uzunluğun 8.6-24 mm arasında olduğu bildirilmektedir (Paulrud ve Rasmussen 2004; Klein ve ark. 2005; Melvin ve ark. 2019). Ancak kanal uzunluğunun her ırk için tanımlanmadığı da literatürlerdeki bir eksiklik olarak dikkat çekmektedir. Dp uzunluklarında, yapılan çalışmalarda ifade edilen, yaklaşık 16 mm'lik farklılığın nedenini, ırklar arasındaki farklılıklar, ayrıca maternal bazı değişkenler oluşturabilir. Mevcut çalışmamızda Holstein, Simental ve Montofon ırklarında, Dp uzunluğu ile ırk arasında, anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı. Çalışmamız kanal uzunluğuna ırkın etkisinin olmayacağını düşündürebilir. Bu görüşümüz, yapılan bir çalışma ile açıklanabilir. Çalışmaya göre, Dp uzunluğu ile meme başı uzunluğu arasındaki pozitif bir korelasyondan bahsedilmektedir (Hebel 1978). Dp uzunluğundaki değişken, hayvanın ırkına göre değil de, meme başı uzunluğuna göre şekillenmektedir. Bu durum aynı ırk içerisinde, farklı meme başı uzunluğuna sahip ineklerde, farklı Dp uzunluklarının ortaya çıkmasının nedenine de açıklık getirebilmektedir. Dolayısıyla Dp uzunluğu, dolaylı olarak, meme başı uzunluğu hakkında da bilgi sahibi olunmasına olanak sağlayabilecektir.

Mevcut çalışma laktasyon sayısı ve döneminin Dp uzunluğunu etkilemediğini ortaya koymaktadır. Ancak bu konuda, elde ettiğimiz bu sonuçlardan, tamamiyle farklı görüşler de mevcuttur. McDonald (1973), kanal uzunluğunun ırk, parite ve laktasyon sayısına göre değişebileceğini göstermektedir. Melvin ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada makinalı sağım yapılan ineklerde paritenin artmasının Dp uzunluğunun artmasına neden olduğunu vurgulamaktadır. Benzer bir görüş, Çelik ve ark. (2008) tarafından desteklenmektedir. Çelik ve ark. (2008) genç hayvanlarda Dp'in yaşlı hayvanlara göre daha kısa

olduğunu belirtmektedirler. Hatta aynı araştırmacılar, süt veriminin kanal uzunluğu daha kısa olan genç hayvanlarda daha yüksek olduğunu vurgulamaktadırlar. Bu farklı görüşlerin temelini araştırmacıların çalıştıkları hayvan ırkı ve süt verimleri oluşturabilir. Bilindiği üzere Dp elastik-kassel bir yapıya sahiptir. Sağımdan önce memede birikmiş olan süt miktarının Dp uyguladığı basınca bağlı olarak kanalın esneyerek uzaması mümkün görülmektedir. Ancak çalışmada kullanılan hayvanların hemen hepsi sağımdan sonra geldiğinden dolayı, Dp'in sağım öncesi ve sonrasındaki uzunluk farklılıkları gözlenemedi. Çelik ve ark. (2008) genç hayvanlarda süt miktarının daha fazla ancak kanal uzunluğunun da daha kısa olduğunu belirtmektedir. Bu görüş, sunulan fikri desteklemektedir. Çünkü süt miktarı, yaptığı basınçla, zamana bağlı olarak kanal büyümesine neden olabilecektir. Çelik ve ark. (2008)'i yaşlı hayvanlarda Dp uzunluğunun daha fazla olduğunu belirtmesi aynı şekilde konuyu izah edecek nitelikte görülmektedir. Sunulan çalışmamız, Dp uzunluğuna yaş, laktasyon sayısı ve döneminin, özellikle sağım öncesi-sonrasını dikkate alınarak, etkisinin mutlaka araştırılması gerekliliğini savunacaktır. Yine farklı ırktan ama aynı yaşta ve laktasyon dönemindeki hayvanlarda Dp uzunluğundaki olabilecek değişim cevaplandırılması gerekli olan bir soru olarak varlığını sürdürmektedir.

Çalışmamızda, elde edilen bulgular ışığında, sağlıklı Dp uzunluğunun memenin doğal savunmasında bir avantaj ya da dezavantaj oluşturamayacağı görüşünü desteklemektedir. Mastitis tüm meme başlarında meydana gelebilmektedir. Ancak mastitisin özellikle arka meme başlarında daha sıklıkla meydana geldiği de kanıtlanmıştır. Arka meme başlarındaki bu yüksek mastitis insidansı, Dp uzunluğu ile açıklanamamaktadır. Benzer bir çalışma Querengässer ve Geishauser (1999) meme başından süt akışı bozukluklarının genelde daha uzun Dp'lerde gözleylebildiklerini, ancak kısa Dp'lerde de benzeri lezyonların sıklıkla oluşabildiğini belirtmektedirler. Arka meme başlarındaki enfeksiyon riski aslında, arka meme başlarındaki dışkı kontaminasyonunun daha fazla olmasıyla doğru orantılıdır. Yani laktojen yolla oluşan mastitis, ahırdaki bakteri oranının meme başına ve buradan da Dp'e yayılarak artmasıyla meydana gelebilir. Böyle bir patogeneze içerisinde arka meme başlarının dışkı ile kontamine olması, kanal uzunluğundan bağımsız, oldukça etkili olacaktır. Bir başka çalışmada Dp uzunluğunun mastitise bağlı değişmediğini

bildirmektedirler (Tóth ve ark. 2023). İleride yapılacak çalışmalarda daha çok sayıda hayvan materyali ile, mastitisli ve sağlıklı memeye sahip olan hayvanlara ait Dp uzunluklarının kıyaslanması bu konuya açıklık getirebilir.

Sunulan çalışma sonuçlarına göre Dp uzunluğunun gebe ve gebe olmayan ineklerde değişmediği saptanmıştır. Bu konuyla ilgili çalışmalara literatür araştırmalarında rastlanılmamıştır. Elde edilen sonuçlar ileride yapılacak çalışmalara için değerli olabilir.

Çalışma verilerimize göre sağımın elle veya makinayla yapılmasının Dp uzunluğunu etkilemediği tespit edilmiştir. Yani kanal uzunluğu sağım şekline göre etkilenmemiştir. Bilindiği üzere Dp elastiki-kassel bir yapıya sahiptir. Kanal uzunluğu sağım sırasında kısa süreliğine değişebilir. Ancak mevcut elastiki kassel yapısından dolayı Dp sağım sonrası eski uzunluğunu koruyacağını düşünmekteyiz. Strapák ve ark. (2017) yaptıkları çalışmalarında meme başı kanalının sağımdan hemen sonra uzadığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar aynı çalışmada meme başı kanalının sağım öncesi konumuna ulaşması için 120 dakikanın geçmesi gerektiğini vurgulamaktadır. Bir başka çalışmada ise makinalı sağım ile meme başı kanal uzunluğunun eski haline dönmesinin meme başı kanalının şekline bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir. Dp'nin sivri meme ucu şekline sahip meme uçlarında 7 saat içinde ve düz meme ucu şekline sahip meme uçlarında 1 saat içinde ön sağım değerlerine geri döndüğü bildirilmektedir (Wieland ve ark. 2018). Sunulan çalışmada kliniğe getirilen tüm ineklerin sabahın erken saatlerinde sağım yapıldığı bilgisi bulunmaktaydı. Yani sağımın üzerinden geçen zaman aralığının fazla olması Dp uzunluklarında farklılığı baskılamış olabilir. Sağımdan kısa bir süre sonra belirli aralıklarla Dp uzunluğunun ölçülmesiyle sağım tekniğinin Dp uzunluğu üzerine etkisini araştırılabilir. Bildiğimiz kadarıyla böyle bir çalışma yapılmamıştır.

Sunulan çalışmada Dp uzunluklarının arka meme başlarında, önlere göre sayısal olarak daha uzun olduğu dikkat çekiciydi. Ancak bu fark istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Özellikle arka meme başlarındaki kanal uzunluğu farklılığı, literatürlerde de bildirilmektedir (Weiss ve ark. 2004; Paulrud ve ark. 2005). Arka meme başları kanalı uzunluklarının önlere göre %5-10 oranında daha uzun olduğunu ifade edilmektedir (Paulrud ve ark. 2005). Ayrıca arka meme loblarında süt üretimi ön meme loblarına göre daha fazladır (Alaçam, 1984). Arka meme başı kanal uzunluklarının, önlere göre, daha uzun olması, arka meme loblardaki süt verimine bağlı olabilir. Uzunluk farklılığının, süt veriminden değil, arka meme başlarının önlere göre daha gelişmiş olmasından (Habermehl 1996) kaynaklanabilir. Dolayısıyla laktasyonun henüz başlamadığı düvelerde ön ve arka meme başı kanalı uzunluklarındaki farklılık bu sorunun cevaplandırılmasına katkı sağlayabilir.

Sunulan çalışma Dp uzunluğunun meme sağlığı açısından pratikte önemli olmadığını ortaya koymaktadır. Yani kanal uzunluğu, mastitis riski açısından, bir avantaj ya da dezavantaj olarak görülmemektedir. Laktasyondaki sağlıklı süt ineklerinde Dp uzunluğunun genetik standart bir uzunluğa sahip olduğu, bu anatomik yapının ilerleyen laktasyonlarda, çok az miktarda uzama yeteneğine rağmen, temelde değişmediği belirlendi.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Bu çalışma Mehmet YILDIZ isimli yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiştir.

Bu çalışma 52nd Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction, isimli kongrede poster sunu olarak sunulmuş, kongre kitabına özet metin olarak basılmıştır.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: SŞ
Denetleme/Danışmanlık: SŞ, MY
Veri Toplama ve/veya İşleme: MY, SŞ
Analiz ve/veya Yorum: MY, SŞ
Makalenin Yazımı: MY, SŞ
Eleştirel İnceleme: SŞ, MY

KAYNAKLAR

- Alaçam E (1984).** Süt İneklerinde Sağım ve Meme Bakımı. *Selçuk Üniversitesi Vet Fak Derg.* (Özel Sayı), 91-105.
- Cheng WN, Han SG (2020).** Bovine mastitis: risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments: A review. *Asian-Australas J Anim Sci*, 33 (11), 1699-1713.
- Çelik HA, Aydın İ, Colak M, Şendag S, Dinç DA (2008).** Ultrasonographic evaluation of age related influence on the teat canal and the effect of this influence on milk yield in brown swiss cows. *Bull Vet Inst Pulawy*, 52, 245-249.
- Davidov I, Boboš S, Radinović M, Erdeljan M (2011).** Effect of different length ductus papillaris on pathomorphological changes in udder parenchyma. Milan Krajinović, Blagoje Stančić (Eds). *Contemporary Agriculture Savremena Poljoprivreda* (pp. 139). Novi Sad, Serbia.
- Grindal RJ, Walton AW, Hillerton JE (1991).** Influence of milk flow rate and streak canal length on new intramammary infection in dairy cows. *J Dairy Res*, 58 (4), 383-388.
- Habermehl KH (1996).** Haut und Hautorgane. In: Nickel R, Schummer A, Seiferle E (Hrsg.): *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere*, Band III, 3. Auflage, Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane, Parey Verlag, Berlin, 443-576.
- Hebel P (1978).** Verhältnisse zwischen verschiedenen Züchten, der Strichkanallänge und den Strichkanaldurchmessern beim Rind. *ZuchtungsK*, 50, 127-131.
- Klein D, Flöck M, Khol JL ve ark. (2005).** Ultrasonographic measurement of the bovine teat: breed differences, and the significance of the measurements for udder health. *J Dairy Res*, 72 (3), 296-302.
- Lacy-Hulbert SJ, Hillerton JE (1995).** Physical characteristics of the bovine teat canal and their influence on susceptibility to streptococcal infections. *J Dairy Res*, 62 (3), 395-404.
- Martin LM, Stöcker C, Sauerwein H, Büscher W, Müller U (2018).** Evaluation of inner teat morphology by using high-resolution ultrasound: changes due to milking and establishment of measurement traits of the distal teat canal. *J Dairy Sci*, 101 (9), 8417-8428.
- McDonald JS (1973).** Radiographic method for anatomic study of the teat canal: changes within the first lactation. *AJ Vet Res*, 34 (2), 169-171.
- Mein, GA (2012).** The role of the milking machine in mastitis control. *Vet Clin North Am Food Anim*, 28 (2), 307-320.
- Mekonnen SA, Koop G, Getaneh AM, Lam TJGM, Hogeveen H (2019).** Failure costs associated with mastitis in smallholder dairy farms keeping Holstein Friesian × Zebu crossbreed cows. *Animal*, 13 (11), 2650-2659.
- Melvin M, Heuwieser W, Virkler PD, Nydam DV, Wieland, M (2019).** Machine milking-induced changes in teat canal dimensions as assessed by ultrasonography. *JDS*, 102 (3), 2657-2669.
- Özyurtlu N (2011).** İneklerde mastitisin ekonomik ve sağlık açısından önemi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg.* 1 (5), 36-38.
- Paulrud CO, Clause S, Andersen PE, Rasmussen MD (2005).** Infrared thermography and ultrasonography to indirectly monitor the influence of liner type and overmilking on teat tissue recovery. *Acta Vet Scand*, 46 (3), 137-147.
- Paulrud CO, Rasmussen MD (2004).** How teat canal keratin depends on the length and diameter of the teat canal in dairy cows. *J Dairy Res*, 71, 253-255.
- Querengässer K, Geishauser T (1999).** Untersuchungen zur Zitzenkanallänge bei Milchabflussstörungen. *Prakt Tierarzt*, 80, 796-804.

- Ruegg PL, Petersson-Wolfe CS (2018).** Mastitis in dairy cows. *Vet Clin-Food Anim Pract*, 34 (3), 9-10.
- Seyfried G (1997).** Die sonographische Messung von Zitzenstrukturen und deren Bedeutung fuer die Eutergesundheit beim Braun-und Fleckvieh. *Vet Med Diss*, 0168.
- Strapák P, Strapáková E, Rušinová M, Szencziová I (2017).** The influence of milking on the teat canal of dairy cows determined by ultrasonographic measurements. *Czech J Anim Sci*, 62 (2), 75-81.
- Şendağ S, Dinç D (1999).** Ultrasonography of the bovine udder. *Turkish J Vet Anim Sci*, 23 (9), 545-552.
- Tóth T, Tóth MT, Abonyi-Tóth Z ve ark. (2023).** Ultrasound examination of the teat parameters of mastitis and healed udder quarters. *Vet Anim Sci*, 21, 100296.
- Weiss D, Weinfurtner M, Bruckmaier RM (2004).** Teat anatomy and its relationship with quarter and udder milk flow characteristics in dairy cows. *J Dairy Sci*, 87 (10), 3280-3289.
- Wieland M, Virkler, PD, Borkowski AH ve ark. (2018).** An observational study investigating the association of ultrasonographically assessed machine milking-induced changes in teat condition and teat-end shape in dairy cows. *Animal*, 13 (2), 341-348.
- Zigo F, Vasil M, Ondrašovičová S ve ark. (2021).** Maintaining optimal mammary gland health and prevention of mastitis. *Front Vet Sci*, 8, 607311.



The Effects on Post-Thaw Sperm Quality and Nuclear DNA Integrity of Supplementation of Low-Density Lipoprotein to Freezing Extender in the Mouse

Cengiz YILDIZ¹,* İbrahim EROL¹

¹Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Reproduction and Artificial Insemination, 31000, Hatay, Türkiye

Received: 10.01.2024

Accepted: 02.02.2024

ABSTRACT

Mice are an important research tool for genetic and molecular biology, allowing researchers to explore a variety of human illness models. Egg yolk is a common component of semen extenders for domestic animals and low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk have some cryoprotective properties. This study aimed to investigate sperm quality characteristics and nuclear DNA integrity after post-thawing in an extender (18% raffinose + 3% skim milk) supplemented with different concentrations of LDL (2.5%, 5.0%, 7.5%, or 10%) in mice. 18% Raffinose+3% skim milk extender was used as a control group without LDL. CD-1 mice were used in the study, and semen was collected from the cauda epididymis and diluted with the extender. The straws were then frozen and thawed to evaluate progressive motility, viability, plasma membrane (HOST), acrosome, and nuclear DNA integrity parameters. Fresh sperm had the highest progressive motility, viability, plasma membrane integrity, and longevity (endurance) of progressive motility for 4 h in HTF solution. The greatest spermatologic results, including nuclear DNA integrity, were determined in fresh sperm ($p<0.05$). The greatest post-thaw progressive motility ($56.7\pm 1.3\%$), viability ($11.6\pm 2.9\%$), membrane integrity ($63.0\pm 2.7\%$), and longevity at the end of the 4 h ($31.3\pm 2.1\%$) were found in the group with supplementation of 2.5% LDL compared with the control group. The lowest progressive motility, viability, and plasma membrane integrity were determined in the 10% LDL group ($p<0.05$). The cryopreservation process increased the rates of fragmented DNA in all tested LDL and control groups compared with fresh sperm ($p<0.05$). There was no statistical difference between the control and experimental groups in terms of nuclear DNA damage after freezing and thawing ($p<0.05$). It was concluded that the addition of 2.5% LDL to the extender improved the spermatological quality parameters after freezing and could be used in the freezing and preservation of mouse sperm as it showed a higher protective effect against cold shock.

Keywords: Low-density lipoprotein, Mouse sperm, Sperm analysis.

öz

Farelerde Sperma Sulandırıcısına Düşük Yoğunluklu Lipoprotein İlavesinin Dondurma Çözdürme Sonrası Sperm Kalitesi ve Nükleer DNA Bütünlüğü Üzerine Etkileri

Fareler genetik ve moleküler biyoloji için önemli bir araştırma aracıdır ve araştırmacıların çeşitli insan hastalığı modellerini keşfetmesine olanak tanır. Yumurta sarısı, evcil hayvanlara yönelik sperma sulandırıcılarının yaygın bir bileşenidir ve yumurta sarısından elde edilen düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) bazı kriyoprotektif özellikleri vardır. Bu çalışma, farede farklı konsantrasyonlarda LDL (%2.5, %5.0, %7.5, %10) ilaveli sperma sulandırıcısında (%18 rafinoz + %3 yağsız süt) dondurma sonrası sperm kalite özelliklerini ve nükleer DNA bütünlüğünü araştırmayı amaçladı. LDL içermeyen kontrol grubu olarak %18 Raffinoz+%3 yağsız süt sulandırıcısı kullanıldı. Çalışmada CD-1 fareler kullanıldı ve kauda epididimisten sperma toplandı ve sperma sulandırıcısı ile sulandırıldı, payetlere çekilerek motilite, canlılık, plazma zarı (HOST), akrozom ve nükleer DNA bütünlüğü parametreleri dondurma sonrası değerlendirildi. Nativ sperma, HTF çözeltisinde 4 saat boyunca en yüksek motilite, canlılık, plazma zarı bütünlüğüne ve dayanıklılığa sahip bulundu. Nükleer DNA bütünlüğü taze spermada en yüksek belirlendi ($p<0.05$). Çözdürme sonrası en yüksek motilite (56.7 ± 1.3), canlılık (11.6 ± 2.9), membran bütünlüğü (63.0 ± 2.7) ve yaşam süresi (31.3 ± 2.1) %2.5 LDL takviyeli grupta, en düşük progresif motilite, canlılık ve plazma membran bütünlüğü ise %10 LDL grubunda belirlendi ($p<0.05$). Kriyoprezervasyon işlemi, taze sperm ile karşılaştırıldığında tüm LDL ve kontrol gruplarında parçalanmış DNA oranlarını arttırdı ($p<0.05$). Kontrol ve deney grupları arasında donma ve çözürme sonrası nükleer DNA hasarı açısından istatistiksel fark yoktu ($p<0.05$). Sulandırıcıya %2.5 LDL ilavesinin dondurma sonrası spermatolojik kalite parametrelerini iyileştirdiği ve fare sperminin dondurulması ve korunmasında daha yüksek oranda soğuk şokuna karşı koruyucu etki gösterdiği için kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Düşük yoğunluklu lipoprotein, Fare spermi, Sperm analizi.



INTRODUCTION

Today, the mouse is used for many studies on mammalian genetics and early development. Mice with transgenes, disrupted genes, or mutant genes are routinely produced, resulting in many useful genomes that must be preserved. To avoid the unintended loss of this unique material, efficient and trustworthy technologies for gamete and embryo cryopreservation are required.

Cryopreservation of mouse spermatozoa has been achieved. Using raffinose and skim milk for cryoprotection, Nakagata has successfully cryopreserved spermatozoa from a range of strains and transgenic stocks (Nakagata 2000). Mouse spermatozoa are highly sensitive to several types of mechanical stress, free oxygen radicals, osmotic changes, and different temperatures (Ward et al. 2003; Yildiz et al. 2007). The most commonly described adverse effect of post-thawing on mouse sperm is the dramatic decrease in sperm motility, plasma membrane integrity, and fertility (Therrien et al. 1999; Yildiz et al. 2010). Long-term storage of sperm is a valuable technique for the preservation of genetic resources. Egg yolk is a common component of semen cryopreservation extenders used in domestic animals. However, the use of egg yolk has negative effects, such as representing a potential risk of bacterial contamination for artificial insemination, and the high-density lipoproteins in egg yolk decrease the quality of semen by causing an efflux of cholesterol from the sperm plasma membrane and resulting in a change in fluidity that increases the sensitivity to cold shock (Ward et al. 2003). Aiming to overcome these risks, various studies have demonstrated the possibility of removing some parts of egg yolk by centrifugation. LDL which is an egg yolk component, increases sperm resistance against cold shock, resulting in improved sperm motility. Some of the egg yolk ingredients could impair spermatozoa respiration and motility. Alternatively, it has been shown that centrifuged chicken egg yolk or purified low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk can improve the quality of semen (Ward et al. 2003). Egg yolks can be fractionated by centrifugation. Egg yolk plasma consists of 85% LDL whereas its granules consist of 12% LDL. However, egg yolk composition is not uniform and could vary depending on the avian species (Takeo and Nakagata 2010; Yildiz et al. 2013). Many studies have observed that the LDL from egg yolk has cryoprotective properties. The LDL can form an interfacial film during the freezing-thawing process by adhering to the cell membrane, protecting the membrane phospholipid integrity and replacing membrane phospholipids that are lost during the cryopreservation process, or by interacting with or binding harmful proteins present in seminal plasma during cryopreservation (Hu et al. 2011; Yildiz et al. 2013; Varela et al. 2020).

The freezing-thawing process induces thermal, osmotic, and oxidative stresses on the sperm including DNA damage, and reduces their functionality and fertilization rate (Yildiz et al. 2007; Tonieto et al. 2010). In previous studies, 4–12% LDL in semen extenders for different species could achieve better results than traditional egg yolk. It was demonstrated that LDL addition to extenders is a promising alternative to the conventional use of egg yolk (Tonieto et al. 2010; Mahiddine and Kim 2021).

In previous studies, the addition of LDL to cryopreservation extenders was studied in boars (Jiang et al. 2006; Yamauchi et al. 2009; Wang et al. 2014), bulls (Moussa et al. 2002; Amirat et al. 2004; Hu et al. 2011), dogs (Junior et al. 2009; Bencharif et al. 2010), rabbits (Iaffaldano et al. 2014), rams (Therrien et al. 1999) and

horses (Moreno et al. 2013). To the best of our knowledge, this is the first research report related to low-density lipoprotein on sperm cryopreservation in mice.

The objective of the current study was to evaluate the sperm quality parameters and nuclear DNA integrity after thawing in extenders supplemented with different concentrations of low-density lipoproteins (2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%) in mouse sperm.

MATERIAL AND METHODS

The study was carried out by obtaining permission from Hatay Mustafa Kemal University Animal Experiments Local Ethics Committee dated 21/05/2019 and numbered 20879420-825, and the study was conducted in accordance with the ethics committee rules. All chemicals used in this study were supplied by Sigma-Aldrich Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

Animals

The mouse strains of 36 CD-1 breeds used in the study were obtained from the Kobay Laboratories (Ankara, Türkiye). During the experiment time, the mice were housed by the experimental animal unit of Hatay Mustafa Kemal University. Light control (12 h light and 12 h dark) was provided. Feed and water were provided *ad libitum*. All mice used in this study were cared for according to the criteria stipulated in the "Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals" determined by the National Academy of Sciences and published by the National Institutes of Health. Male mice 12–14 weeks old used in the study were sacrificed by the cervical dislocation method under ketamine/xylazine anesthesia, and the cauda epididymis, which was removed from the adipose tissue by surgical method, was dissected.

Extraction of low-density lipoprotein (LDL)

LDL is obtained from egg yolks according to Moussa et al. (2002). The yolk was centrifuged at 10000 g for 45 min at 4 °C after dilution (1:1) with 0.17M NaCl. The supernatant was collected and centrifuged again at 10000 g x 45 mins at 4 °C. After centrifugation, plasma was mixed with %40 (w/v) ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄) (Sigma 1.01217, Darmstadt, Germany) at pH 8.7 to precipitate subunits at 4 °C. Ammonium sulfate was added to the plasma at a ratio of approximately 1:1 until precipitation was observed. Centrifugation at 10000 g for 45 mins at 4 °C was practiced separating the supernatant from the sediment.

The supernatant was then dialyzed (Sigma Aldrich D6066, Darmstadt, Germany) against distilled water to eliminate ammonium sulfate for 12 h at 4 °C with the distilled water changed every 2 h. After ammonium sulfate elimination, the substance was centrifuged at 10000 g for 45 min, and the LDL-rich supernatant was collected, aliquoted, and stored at -80 °C for further use. The extracted LDL was used as dried.

Preparation of sperm extenders

In this study, low-density lipoproteins (LDL) (2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%) were added to the mouse sperm extender, which is a combination of 18% raffinose (Biobasic-RJ392) + 3% skimmed milk powder (Monn-bio) (Moustacas et al. 2011). Spermatozoa in the epididymal tissue were diluted separately with the diluents in the control and study groups and then incubated at 37 °C for 10 min. Epididymal spermatozoa samples were adjusted to a final concentration of 1-3 x 10⁷ /ml spermatozoa. The freezing extender (18% raffinose + 3% skimmed milk powder without LDL) was used as a control group. The chemicals

were dissolved in 100 ml of distilled water and cooled and centrifuged at 14000g for 10 min. After centrifugation, the supernatant was collected and passed through filters with 0.22- μ m pores. Sperm extenders were prepared individually by adding low-density lipoprotein (LDL) at the determined rates (2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10%). After the freezing-thawing process, the sperm samples were transferred into an HTF solution for evaluation. The HTF solution was prepared according to Quinn et al. (1985). The formulation of human tubal fluid (HTF medium) was 101.6 NaCl, 4.69 KCl, 0.20 MgSO₄·7H₂O, 0.37 KH₂PO₄, 2.04 CaCl₂·2H₂O, 25 NaHCO₃, 2.78 glucose, 0.33 Na pyruvate, 21.4 Na lactate, 100 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin SO₄, 0.001% (wt/vol).

Sperm collection, freezing, and thawing procedures

Sperm collection from the cauda epididymides of mice was performed according to Takeo and Nakagata (2018). The left and right caudal epididymis were aseptically dissected and placed in the same petri dish (Isolab 60x15mm) containing the extender preheated to 37 °C in an incubator. Under a stereomicroscope, Cauda epididymides were minced using a scalpel and scissors. Spermatozoa were allowed to exit into the extender for 10 min in the incubator. All experimental groups were frozen and thawed using the Nakagata (2000) protocol. Sperm samples were also examined before being processed as fresh sperm. Samples with a motility of less than 50% were not frozen. Briefly, 0.25 ml straws, the ends of which were closed with a press, were frozen in liquid nitrogen (LN₂) vapor for 10 min on the shelves. The level of the straws in the styrofoam was 3.5 cm, and the straws were placed on a shelf approximately 6 cm above the liquid nitrogen level. At the end of 10 min, the straws were taken from the shelf and immersed directly in LN₂. Subsequently, the straws were transferred to nitrogen tanks until use. The frozen samples for thawing were quickly transferred to a 37 °C water bath for 30 sec.

Sperm analysis

Thawed straws were transferred into a microfuge (Isolab) tube containing HTF medium (1:4) and kept in a 37 °C carbon dioxide incubator. Spermatological analyses of thawed sperm samples, which were kept in the incubator for 10 min, were performed.

Assessment of progressive motility

The examinations were performed after taking 10 μ l of semen samples, diluting the HTF solution with an additional 1/10 ratio, and allowing it to equilibrate for 10 min. Progressive motility determination of sperm samples was performed using a Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel). Briefly, 10 μ l of semen diluted with HTF prepared after incubation was taken on a Makler slide and evaluated at 200x magnification under a phase-contrast microscope (Olympus CX21, Japan). At least 200 spermatozoa were counted from motile spermatozoa that moved forward in the slide area, as strong, smooth linear spermatozoa, and non-motile spermatozoa. In the study groups, progressive motility will be evaluated for 4 hours and recorded as the longevity of progressive motility.

Assessment of the dead spermatozoa

Dead examination of the sperm was performed using the eosin staining method (WHO 1999). Briefly, 5 μ L of eosin solution and 5 μ L of sperm sample were mixed on a microscope slide, smeared, and quickly (2 seconds) dried in a preheated area at 60 °C. The prepared samples of 300 cells were counted at 400x magnification under a phase-

contrast microscope (Olympus CX21, Japan). In the evaluation, while dead spermatozoa were dyed, live spermatozoa did not receive the dye.

Assessment of plasma membrane integrity (Hypo Osmotic Swelling Test/ HOST)

The HOS test method was used to evaluate membrane function integrity (Jeyendran 1984). The HOS test was evaluated by mixing 30 μ L of sperm sample with 300 μ L of HOST solution with an osmolarity of 100 mOsm (1.351 g fructose + 0.735 g sodium citrate per 100 mL of distilled water) and incubating at 37 °C for 60 min. Viable spermatozoa with active membrane function were identified as swollen and with a curled tail.

Assessment of acrosome integrity

Analysis of acrosome integrity was performed as indicated by Somfai et al (2002). Hancock solution was used for fixation and determination of acrosome damage. It was ensured that 1 ml of Hancock solution and 20 μ l of semen were detected in the Eppendorf tube. 50 μ l of this mixture was taken on a slide, covered with a coverslip, and examined with a 100x objective with oil immersion. The percentage of spermatozoa with acrosome damage was determined and counted in 200 spermatozoa in total.

Assessment of the fragmented DNA rates

In this study, the TUNEL assay method was used to determine the DNA damage in spermatozoa. For the TUNEL assay, a commercial kit (ApopTag Fluorescein in Situ Detection Kit, Sigma, S7110) was used, and the sperm suspension was prepared and evaluated according to the manufacturer's instructions. However, some parts of the protocol have been modified as follows; to separate the spermatozoa from the extender, it was washed by centrifugation (twice at 500 g, in 1 mL of PBS containing 0.01% polyvinyl-alcohol (PVA)). The semen pellet formed after centrifugation was incubated for 40 min in PBS containing 0.1% Triton X-100 to ensure cell permeability. After each treatment to the sperm suspensions, they were washed once in PBS at 500 g for 10 min in centrifugation. TDT enzyme was added as stated in the kit protocol after incubating at room temperature for 10 sec with an equilibration buffer. Incubation was followed for 60 min at 37 °C in a dark chamber. In the next step of the process, STOP solution was added to complete the activation of the TDT enzyme. Subsequently, the sperm suspension was washed twice in PBS. The DNA of the cells was determined by peroxidase-dependent anti-digoxigenin antibody (ADG) after 30 min of incubation in a moist and dark room. Sperm samples were incubated for 1 h with propidium iodide (PI) for counterstaining. Finally, the slides were smeared from the suspension, and all samples were examined under a fluorescent microscope to calculate the percentage of TUNEL-positive sperm (Sharma et al. 2013; Evenson 2016).

Statistical Analysis

All values found at the end of the study were analyzed in SPSS (SPSS 22) using ANOVA. The comparison of LDL groups with the control group was made using Dunnett's test. Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was adjusted at p<0.05.

RESULTS

Spermatological values determined in fresh sperm and after freezing-thawing of mouse sperm with different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) are given in Tables 1 and 2.

1) Progressive motility: As can be observed in Table 1, fresh sperm progressive motility, $72.4 \pm 3.7\%$, was found to be the highest when compared to the other cryopreserved groups; Control, 2.5% LDL, 5.0% LDL, 7.5% LDL, and 10% LDL, as $43.3 \pm 2.6\%$, $56.7 \pm 1.3\%$, $40.7 \pm 1.9\%$, $27.5 \pm 1.7\%$, and $12.5 \pm 2.9\%$, respectively ($p < 0.05$). After freezing and thawing, the progressive motility rate in the group containing 2.5% LDL was higher than that in the control and other study groups ($p < 0.05$). However, when compared with the progressive motility rate of fresh sperm, the 2.5% LDL group was found to be lower than that of fresh sperm ($p < 0.05$). The progressive motility rate of the group with 10% LDL was found to be the lowest among all study groups ($p < 0.05$).

2) Longevity of progressive motility: When the progressive motility results up to 4 h in HTF medium after thawing were examined, it was found that the progressive motility rates of fresh sperm at the 1st, 2nd, 3rd, and 4th hours were $69.6 \pm 3.4\%$, $63.2 \pm 2.7\%$, $53.2 \pm 3.4\%$, and $45.4 \pm 2.8\%$ respectively, as shown in Table 2, and the results were higher compared with the other research groups ($p < 0.05$). Considering the cryopreserved groups, the progressive motility rates of 2.5% LDL, $52.7 \pm 2.4\%$, 4.7% LDL, $47.1 \pm 3.6\%$, 4.9% LDL, $40.9 \pm 1.8\%$, and 3.1% LDL, $31.3 \pm 2.1\%$, respectively, were found to be higher than the control and other study groups during 4 h. At the same time, the lowest longevity of progressive motility rates was found in the 10% LDL group up to 4 h ($p < 0.05$).

3) Dead spermatozoa rate: Considering the rates of dead spermatozoa, the fresh sperm group had the lowest rate of dead sperm compared with the other cryopreserved study groups, which are Control, 2.5% LDL, 5.0% LDL, 7.5% LDL, and 10% LDL, $18.6 \pm 1.7\%$, $11.6 \pm 2.9\%$, $24.2 \pm 1.4\%$, $19.6 \pm 1.5\%$, $56.4 \pm 1.3\%$, respectively ($p < 0.05$). When comparing values between cryopreserved LDL and control groups after freezing-thawing, 2.5% LDL had the lowest dead spermatozoa rate whereas 10% LDL had the highest percentage of dead sperm ($p < 0.05$).

4) Plasma membrane integrity (HOST): Contemplating the values of the HOS Test showing membrane integrity, curled-tailed sperm rates of fresh sperm were the highest ($78.1 \pm 3.9\%$) compared with other studied groups; $48.9 \pm 3.1\%$, $63.0 \pm 2.7\%$, $41.1 \pm 1.9\%$, $33.7 \pm 2.6\%$, $14.3 \pm 1.8\%$,

respectively ($p < 0.05$). After freezing-thawing, the integrated membrane rate was found to be higher in the group containing 2.5% LDL than in the other study groups ($p < 0.05$).

5) Abnormal acrosome: Considering the acrosome integrity rates, there was no statistical difference between fresh sperm and all other frozen and thawed study groups in terms of acrosome damage, as shown in Table 1 ($p > 0.05$). While the lowest sperm acrosome damage rate was found in fresh sperm ($0.8 \pm 1.3\%$), the highest acrosome damage was found at $6.4 \pm 1.3\%$ in the 7.5% LDL group after freezing and thawing.

6) DNA fragmentation rate: Fragmented DNA values of mouse sperm detected by the TUNEL assay after freezing-thawing with different concentrations of low-density lipoproteins are given in Figure 1. The cryopreservation process in our studies also significantly increased the rate of abnormal sperm DNA in all cryopreserved groups compared with the rate in fresh control in mouse sperm ($p < 0.05$). There were no statistical differences in the rate of nuclear DNA integrity in the comparison with the control and by adding different concentrations of LDL in 2.5%, 5.0%, 7.5%, and 10% groups, respectively ($p > 0.05$).

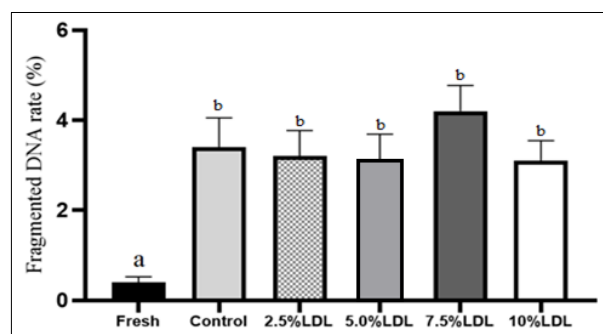


Figure 1: Fragmented DNA rates detected after freezing-thawing of mouse sperm with different concentrations of low-density lipoproteins (n:6). $p < 0.05$: Different letters on bars are statistically significant.

Table 1: Spermatological values determined after freezing-thawing of mouse sperm with different concentrations of LDL (n:6).

Study Groups	Progressive motility (%)	Dead sperm (%)	Plasma membrane integrity (%)	Abnormal acrosome (%)
Fresh Sperm	72.4 ± 3.7^a	1.6 ± 1.9^a	78.1 ± 3.9^a	0.8 ± 1.3^a
Control (RSM)	43.3 ± 2.6^b	18.6 ± 1.7^c	48.9 ± 3.1^c	5.4 ± 1.9^b
RSM + 2.5% LDL	56.7 ± 1.3^c	11.6 ± 2.9^b	63.0 ± 2.7^b	4.7 ± 1.8^b
RSM + 5.0% LDL	40.7 ± 1.9^b	24.2 ± 1.4^c	41.1 ± 1.9^{cd}	5.2 ± 2.4^b
RSM + 7.5% LDL	27.5 ± 1.7^d	19.6 ± 1.5^c	33.7 ± 2.6^d	6.4 ± 1.3^b
RSM + 10% LDL	12.5 ± 2.9^e	56.4 ± 1.3^d	14.3 ± 1.8^e	4.9 ± 3.2^b

^a $p < 0.05$: Different letters on the same column are statistically significant.

Table 2: Longevity of progressive motility values determined after freezing-thawing of mouse sperm with different concentrations of LDL in HTF (n:6)

Study Groups	Longevity of progressive motility (%) (hours)			
	1	2	3	4
Fresh Sperm	69.6±3.4 ^a	63.2±2.7 ^a	53.2±3.4 ^a	45.4±2.8 ^a
Control (RSM)	41.4±1.9 ^b	23.0±2.7 ^b	20.1±2.5 ^b	11.6±3.2 ^b
RSM + 2.5% LDL	52.7±2.4 ^c	47.1±3.6 ^c	40.9±1.8 ^c	31.3±2.1 ^c
RSM + 5.0% LDL	38.8±3.2 ^b	26.2±1.7 ^b	23.6±2.8 ^b	10.3±3.3 ^b
RSM + 7.5% LDL	24.6±1.8 ^d	20.4±1.9 ^b	18.8±3.2 ^b	9.2±1.3 ^b
RSM + 10% LDL	10.7±2.6 ^e	8.9±1.6 ^d	7.3±2.1 ^d	2.6±3.3 ^d

p<0.05: Different letters on the same column are statistically significant.

DISCUSSION AND CONCLUSION

Most mammalian species require cryoprotectants during the freezing and thawing processes, and egg yolk is one of the most commonly used substances (Scott and Baynes 1980). A resistance component that serves to protect sperm from the effects of cold shock and storage factors that aid in retaining sperm motility and viability are responsible for egg yolk's favorable effect on sperm cryopreservation (Jamieson and Leung 1991). Despite the advantages of egg yolk in extenders, the rising interest in international semen transit legislation has raised questions about egg yolk use among authorities involved in biosecurity issues. Inconsistent composition, egg yolk granules that impair sperm motility, cryoprotectant antagonists, and other negative aspects of egg yolk have also been described, according to certain sources (Ansari et al. 2010). Furthermore, high-density lipoproteins in egg yolks decrease the quality of semen by causing an efflux of cholesterol from the sperm plasma membrane and resulting in a change in fluidity that increases the sensitivity to cold shock (Amirat et al. 2005; Yildiz et al. 2013). However, low-density lipoproteins (LDL) may adhere to the sperm cell membrane and form an interfacial film during the freezing process (Anton et al. 2003; Bergeron et al. 2004). Phospholipids released from LDL can form a protective film at the surface of the sperm membranes, which prevents the efflux of phospholipids and cholesterol (Hu et al. 2006). In addition, LDL forms a complex with seminal plasma proteins (BSP-A1/A2, BSP-A3, and BSP-30-kDa), which interacts with the sperm membranes, resulting in a reduced efflux of phospholipids and cholesterol and increased sperm protection against cold shock-induced damage (Bergeron et al. 2004; Takeo and Nakagata 2018). Despite the stated positive and negative effects of egg yolk, in this study, after freezing and thawing, the progressive motility, live sperm rate, membrane integrity, and longevity of progressive motility rates in the group containing 2.5% LDL were found to be better than the other tested groups and control (p<0.05). In other words, when we looked at the sperm viability markers together (table 1), 2.5% LDL was well protected and improved post-thawed spermatologic parameters compared with the other studied groups (5.0%, 7.5%, and 10%) and control during the cryopreservation process (p<0.05). The ideal amount of supplemented LDL in the extender is critical for obtaining better cryo survival. In previous studies, optimal rates of LDL addition to cryopreservation extenders against cold shock were 4–6%

(Yamauchi et al. 2009), 9.0% (Jiang et al. 2006), and 0.09 g/ml (Wang et al. 2014) in boars, 8.0% in bulls (Moussa et al. 2002; Amirat et al. 2004; Hu et al. 2011); 8.0% in Mithun bulls (Patil et al. 2020); 12% (Dalal et al. 2020) and 10% in buffaloes (Akhter et al. 2011), 6% and 6.0%, 8.0%, or 10% in dogs (Junior et al. 2009; Bencharif et al. 2010), 20% in peccaries (Souza et al. 2015); 10% in rabbits (Iaffaldano et al. 2014); 4.0% in roosters (Shahverdi et al. 2015), 8.0% in rams (Tonieto et al. 2010), and 2.0% in horses (Moreno et al. 2013). We found that 2.5% LDL had greater cryosurvival results compared with control group in the mice. In addition, according to Bencharif et al. (2010) differences in the optimal LDL concentrations used for the cryopreservation of semen from various animal species, including the collared peccaries, could be due to variations in the biochemical composition of the sperm plasma membrane. Therefore, it can be assumed that the success rates of cryosurvival are LDL dose and species-dependent. In addition, for useful effects of LDL, has also been reported that LDL supplementation to extender can increase the amount of cellular total antioxidants against reactive oxygen radicals. Perumal et al. (2016) noted that the use of 8.0% LDL for the freezing of semen from Mithun (*Bos frontalis*) produced a post-thawing increase in total antioxidants, as well as a reduction in the lipid peroxidation of semen, as we found affirmative effects of 2.5% LDL on general viability parameters (Table 1).

Supplementation of 7.5% LDL and 10% LDL to extender caused the lowest sperm quality parameters after thawing (Table 1). Excess of the optimal LDL concentration decreased sperm quality after cryopreservation in both groups. Similar studies have reported that a high level of LDL leads to LDL aggregation, resulting in the depression of LDL functions (Moussa et al. 2002). The excessive concentration of LDL causes high fluidity of the plasma membrane and reduces osmotic pressure when LDL concentration increases. It could also be that LDL inactivation of the effect of aggregated LDL and sperm cells more vulnerable to membrane damage, these detrimental effects lead to a decrease in sperm quality after cryopreservation (Moussa et al. 2002; Hu et al. 2011; Perumal et al. 2016).

The EY-based extender might be responsible for capacitation-like changes during cryopreservation because of its calcium ingredients, progesterone, and HDL components. To overcome this problem, the LDL extracted from EY showed a better post-thaw semen quality than the LDL cryopreserved in the EY-based extender (Moussa et al. 2002; Witte et al. 2009). LDL has a protective effect against

sperm cryopreservation. Thereafter, many studies have reported that the LDL-based extender improved the post-thaw sperm motility and fertility in different species (Amirat et al. 2004; Li et al. 2006; Moustacas et al. 2011; Patil et al. 2020). Dalal et al. (2020) indicated that a 12% LDL concentration increases sperm quality for the cryopreservation of buffalo sperm. Dong et al. (2011) LDL did not offer any additional benefits in terms of post-thaw motility compared with 20% egg yolk in monkeys. This finding does not agree with our study. An increase in LDL concentration in the extender above 10% leads to a decrease in sperm quality after cryopreservation (Moussa et al. 2002). This result is in agreement with our study.

Considering the acrosome integrity rates, there were no statistical differences among the study groups in terms of acrosome damage, as shown in Table 1 ($p>0.05$). However, there were statistical differences between fresh sperm and other tested LDL groups and the control ($p<0.05$). The protective properties of egg yolk, low-density lipoprotein (LDL), and skim milk against the effects of cold shock on plasma and acrosomal membranes during cryopreservation have been previously documented (Therien et al. 1999; Bencharif et al. 2008; Hu et al. 2011) and also stated that extenders based on LDL gave higher proportions of acrosome and plasma-intact sperm, repairing acrosomal membrane phospholipids, after post-thawed.

The paternal genetic contribution to healthy offspring depends critically on the integrity of mammalian sperm DNA. The accurate transmission of paternal genetic information depends on the integrity of the sperm DNA.

Prerequisites for fertilization include the normal stabilization and decondensation of sperm chromatin in the nucleus after sperm penetration into the cytoplasm of the oocyte (Flaherty et al. 1995). The effects of cryopreservation on the integrity of the sperm nucleus are not well understood. However, it has been reported that the freezing and thawing steps of the cryopreservation process can lead to an increase in inappropriate chromatin condensation in the sperm of boars (Fraser and Strzezek 2004), horses (Li et al. 2006), rams (Peris et al. 2004), and humans (Royere et al. 1988; Donnelly et al. 2001; Hammadeh et al. 2001) and Chohan et al. (2004) recently reported that after the freeze-thaw process in human sperm, normal chromatin packaging is drastically reduced. Likewise, the cryopreservation process in our studies also significantly increased the rate of abnormal sperm DNA in all control and LDL cryopreserved groups compared with the rate of fresh sperm in mouse sperm ($p<0.05$) (Figure 1).

The results indicate that an extender supplemented with 2.5% LDL provides greater beneficial effects on progressive motility, cell viability, and membrane integrity during cryopreservation in the mouse sperm. A freezing extender supplemented with 2.5% LDL is suitable for mouse sperm cryopreservation.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors report no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGMENT

This research was funded by the Hatay Mustafa Kemal University BAP (Scientific Research Project Coordinating) [grant number 22.GAP.017].

This study is summarized from İbrahim EROL's master's thesis titled "Fare Spermasının Dondurulması Üzerine Düşük Yoğunluklu Lipoproteinlerin Etkisi", supervised by Prof. Dr. Cengiz YILDIZ.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea / Concept: CY, İE
Supervision / Consultancy: CY
Data Collection and / or Processing: İE
Analysis and / or Interpretation: CY
Writing the Article: CY, İE
Critical Review: CY

REFERENCES

- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA et al. (2011).** Effect of low-density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, 76 (4), 759-764.
- Amirat L, Anton M, Tainturier D et al. (2005).** Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. *Reproduction*, 129 (4), 535-543.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L et al. (2004).** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61 (5), 895-907.
- Ansari MS, Rakha BA, Anrabi SMH, Akhter S (2010).** Usefulness of powdered and fresh egg yolk for cryopreservation of Zebu bull spermatozoa. *Reprod Biol*, 10 (3), 235-240.
- Anton M, Martinet V, Dalgalarondo V et al. (2003).** Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem*, 83 (2), 175-183.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M et al. (2008).** The advantages of LDL (low-density lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, 70 (9), 1478-1488.
- Bencharif D, Amirat L, Garand A et al. (2010).** Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex® and LDL (Low-Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*, 119 (3-4), 305-313.
- Bergeron A, Crête MR, Brindle Y, Manjunath P (2004).** Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol Reprod*, 70 (3), 708-717.
- Chohan KR, Griffin JT, Carrell DT (2004).** Evaluation of chromatin integrity in human sperm using acridine orange staining with different fixatives and after cryopreservation. *Andrologia*, 36 (5), 321-326.
- Dalal J, Chandolia RK, Pawaria S et al. (2020).** Low-density lipoproteins protect sperm during cryopreservation in buffalo: Unraveling mechanism of action. *Mol Reprod Dev*, 87 (12), 1231-1244.
- Dong QX, Rodenburg SE, Hill D, VandeVoort CA (2011).** The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl*, 13 (3), 459.
- Donnelly ET, McClure N, Lewis SE (2001).** Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril*, 76 (75), 892-900.
- Evenson DP (2016).** The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA®) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. *Anim Reprod Sci*, 169, 56-75.
- Flaherty SP, Dianna P, Swann NJ, Matthews CD (1995).** Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 10 (10), 2623-2629.
- Fraser L, Strzezek J (2004).** The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5 degrees C and 16 degrees C. *Folia Histochem Cytobiol*, 42 (1), 49-55.
- Hammadeh ME, Greiner S, Rosenbaum P, Schmidt W (2001).** Comparison between human sperm preservation medium and TEST-yolk buffer on protecting chromatin and morphology integrity of human spermatozoa in fertile and subfertile men after freeze-thawing procedure. *J Androl*, 22 (6), 1012-1018.
- Hu JH, Jiang ZL, Lv RK et al. (2011).** The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. *Cryobiology*, 62 (1), 83-87.
- Hu JH, Li QW, Li G et al. (2006).** The cryoprotective effect on frozen-thawed boar semen of egg yolk low-density lipoproteins. *Asian-Aust J Anim Sci*, 19 (4), 486-490.

- Iaffaldano N, Iorio MD, Rosato MP, Manchisi A (2014). Cryopreservation of rabbit semen using non-permeable cryoprotectants: effectiveness of different concentrations of low-density lipoproteins (LDL) from egg yolk versus egg yolk or sucrose. *Anim Reprod Sci*, 151 (3-4), 220-228.
- Jamieson BG, Leung LP (1991). Fish evolution and systematics: evidence from spermatozoa: with a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, England.
- Jeyendran RS (1984). Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Reproduction*, 70 (1), 219-228.
- Jiang ZL, Li QW, Li WY et al. (2006). Effect of low-density lipoprotein on DNA integrity of freezing-thawing boar sperm by neutral comet assay. *Anim Reprod Sci*, 99 (3-4), 401-407.
- Junior ASV, Corcini CD, Ulguim RR et al. (2009). Effect of low-density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci*, 115 (1-4), 323-327.
- Li HG, Liao AH, Ding XF, Zhou H, Xiong CL (2006). The expression and significance of CATSPER1 in human testis and ejaculated spermatozoa. *Asian J Androl*, 8 (3), 301-306.
- Mahiddine FY, Kim MJ (2021). Overview on the Antioxidants, Egg Yolk Alternatives, and Mesenchymal Stem Cells and Derivatives Used in Canine Sperm Cryopreservation. *Animals*, 11 (7), 19-30.
- Moreno D, Bencharif D, Amirat L et al. (2013). Preliminary results: the advantages of low-density lipoproteins for the cryopreservation of equine semen. *J Equine Vet Sci*, 33 (12), 1068-1075.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M (2002). Low density Lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, 57 (6), 1695-1706.
- Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA et al. (2011). Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, 75 (2), 300-307.
- Nakagata N (2000). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mamm Genome*, 11 (7), 572-576.
- Patil S, Kumar P, Singh G et al. (2020). Semen dilution effect on sperm variables and conception rate in buffalo. *Anim Reprod Sci*, 214, 106304.
- Peris S, Morier A, Dufour M, Bailey JL (2004). Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J Androl*, 25(2), 224-233.
- Perumal P, Srivastav SK, Ghosh SH et al. (2016). Effects of low-density lipoproteins as an additive on quality parameters and oxidative stress following cryopreservation of Mithun (*Bos frontalis*) spermatozoa. *Reprod Domest Anim*, 51 (5), 708-716.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985). Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44 (4), 493-498.
- Royere D, Hamamah S, Nicolle JC, Barthelemy C, Lansac J (1988). Freezing and thawing alter chromatin stability of ejaculated human spermatozoa: fluorescence acridine orange staining and Feulgen- DNA cytophotometric studies. *Gamete Res*, 21, 51-57.
- Scott AP, Baynes SM (1980). A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J Fish Biol*, 17, 707-739.
- Shahverdi A, Sharafi M, Gourabi H et al. (2015). Fertility and flow cytometric evaluations of frozen-thawed rooster semen in cryopreservation medium containing low-density lipoprotein. *Theriogenology*, 83, 78-85.
- Sharma R, Masaki J, Agarwal A (2013). Sperm DNA fragmentation analysis using the TUNEL assay In Spermatogenesis. Humana Press, Totowa NJ, 121-136.
- Somfai T, Bodo SZ, Nagy SZ et al. (2002). Simultaneous evaluation of viability and acrosome integrity of mouse spermatozoa using light microscopy. *Biotec Histochem*, 77 (3), 117-120.
- Souza ALP, Lima GL, Peixoto GCX et al. (2015). Sperm characteristics following freezing in extenders supplemented with whole egg yolk and different concentrations of low-density lipoproteins in the collared peccary (*Pecari tajacu*). *Reprod Biol*, 15 (4), 223-228.
- Takeo T, Nakagata N (2018). Mouse sperm cryopreservation using cryoprotectant containing l-glutamine. *Cold Spring Harb Protoc*, (6).
- Takeo T, Nakagata N (2010). Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm. *J Mamm Ova Res*, 27, 70-78.
- Thérien I, Moreau R, Manjunat P (1999). Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, 61 (3), 590-598.
- Toniato RA, Goularto KL, Gastal GDA et al. (2010). Cryoprotectant effect of trehalose and low-density lipoprotein in extenders for frozen ram semen. *Small Rumin Res*, 93 (2-3), 206-209.
- Varela E, Rojas M, Restrepo G (2020). Membrane stability and mitochondrial activity of bovine sperm frozen with low-density lipoproteins and trehalose. *Reprod Domest Anim*, 55 (2), 146-153.
- Wang P, Wang YF, Wang CW et al. (2014). Effects of low-density lipoproteins extracted from different avian yolks on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. *Zygote*, 22 (2), 175-181.
- Ward MA, Kaneko T, Husakabe H et al. (2003). Long-term preservation of mouse spermatozoa after freeze-drying and freezing without cryoprotection. *Biol Reprod*, 69 (6), 2100-2108.
- Witte TS, Schäfer-Somi S, Kuchar A et al. (2009). Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*, 110 (3-4), 293-305.
- World Health Organization (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Yamauchi S, Nakagura S, Lay K et al. (2009). Characteristics of Okinawan native Agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to the freezing extender. *J Reprod Dev*, 0906260187-0906260187.
- Yildiz C, Bozkurt Y, Yavas I (2013). An evaluation of soybean lecithin as an alternative to avian egg yolk in the cryopreservation of fish sperm. *Cryobiology*, 67 (1), 91-94.
- Yildiz C, Law N, Ottaviani P et al. (2010). Comparison of sperm quality and DNA integrity in mouse sperm exposed to various cooling velocities and osmotic stress. *Theriogenology*, 74 (8), 1420-1430.
- Yildiz C, Ottaviani P, Law N et al. (2007). Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, 33 (3), 585-595.