



ANTAKYA VETERİNER

BİLİMLERİ DERGİSİ

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



THE JOURNAL

OF ANTAKYA VETERINARY SCIENCES



Antakya Veteriner Bilimleri Dergisi

The Journal of Antakya Veterinary Science

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

CİLT/VOLUME: 3

SAYI/ISSUE: 2

YIL/YEAR: 2024

Yılda iki defa yayınlanır
Published bi-annually

Yayın Türü/Publication Type:
Online-Sürelî Yayın/Online-Periodicals

Yayımlanma Tarihi/Publication Date:
23.12.2024

Editörler Kurulu:

Doç. Dr. FIRAT DOĞAN (Baş Editör)

Prof. Dr. Murat YÜKSEL

Doç. Dr. Ayşe Merve KÖSE

Doç. Dr. Tuncer KUTLU

Doç. Dr. Mehmet GÜVENÇ

Doç. Dr. Mehmet Zeki Yılmaz DEVECİ

Doç. Dr. Serkan İrfan KÖSE

Doç. Dr. Ece KOLDAŞ ÜRER

Dr. Öğr. Üyesi Nurdan COŞKUN

Dergi Kurulu:

Prof. Dr. Fikret KARACA

Doç. Dr. Fırat DOĞAN

Doç. Dr. Cafer Tayyar ATEŞ

Doç. Dr. Ayşe Merve KÖSE

Doç. Dr. Tuncer KUTLU

Doç. Dr. Serkan İrfan KÖSE

Antakya Veteriner Bilimleri Dergisi Adına Sahibi
On the behalf of The Journal of Antakya Veterinary
Science, owner;

Veteriner Fakültesi Dekanı: **Prof. Dr. Pınar COŞKUN**

Baş Editör / Chief Editor

Doç. Dr. Fırat DOĞAN

Mizanpaj Editörü:

Doç. Dr. Serkan İrfan KÖSE

Bu eser [Creative Commons Atıf 4.0 Uluslararası Lisansı](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) ile lisanslanmıştır (CC-BY-NC). / Licensed under Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International Licence (CC-BY-NC)



İçindekiler / Contents

Cilt 3, Sayı 2

23.12.2024

Araştırma makalesi / Research article

Cold and wet wrap therapy for relieving erythema in canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions 27-31

Kerem Ural*, Hasan Erdoğan, Songül Erdoğan, Cansu Balıkcı

Araştırma makalesi / Research article

Phylogenetic Analysis and Genetic Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein of Cattle in Burdur Province 32-39

Ali Küçük*, Özge Sevinç Korkmaz Akar, Yakup Yıldırım, Kamil Atlı

Araştırma makalesi / Research article

Evaluation of the alterations in some blood biochemical parameters and minerals during gestation period in *Damascus* goats 40-49

Serkan İrfan KÖSE *, Ece Koldaş ÜRER, Ayşe Merve KÖSE

Derleme makalesi / Review article

Fare sperminin kriyoprezervasyonu 50-57

İbrahim GÜVENÇ*, Cengiz YILDIZ

Derleme makalesi / Review article

Köpeklerde hemogram parametrelerinin davranış üzerine etkisi 58-63

Halil Yavuz, Duygu Arslan*, Yavuzkan Paksoy

Derleme makalesi / Review article

Veteriner Hekimlikte Homeopatik Viscum Album Kullanımı: Kansere Farklı bir Bakış 64-68

Bikem Turanoğlu*, M. Erman Or, Lora Koenhemi

Araştırma makalesi / Research article

Cold and wet wrap therapy for relieving erythema in canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions

Kerem Ural^{1a*}, Hasan Erdoğan^{1b}, Songül Erdoğan^{1c}, Cansu Balıkcı^{1d}¹ *Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Internal Medicine, Aydın, TURKEY*

Cold and wet wrap therapy for relieving erythema in canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

28.07.2024

Revizyon/Revised:

20.10.2024

Kabul / Accepted:

30.10.2024

ORCID:

^a 0000-0003-1867-7143^b 0000-0001-5141-5108^c 0000-0002-7833-5519^d 0000-0002-6261-162X

Abstract:

The frequent use of humidified bandages for diminishing inflamed tissue related to atopic dermatitis, is a well-known old remedy. This study aimed to evaluate the potential therapeutic effects of cold and wet bandage therapy (co-wewt) on canine atopic dermatitis (cAd) and cutaneous adverse food reactions (cAFr). Comparative analysis of epidermal temperature and erythema scores was performed by an expert group to determine the efficacy of co-wewt therapy and the place of this treatment approach in clinical practice. In the present study co-wewt by use of Pertek Thermal Water was well tolerated in both dogs with cAd and cAFr, due to probable cooling effect on the cutaneous tissue and the rapid improvement in skin inflammation. This was supported by the comparative evaluation of altered epidermal temperature (33.49 ± 0.21 vs 23.62 ± 0.95) and VAS-ESS score [ADASI 3.25 ± 0.17 vs 0.38 ± 0.13 , respectively before and after co-treatment], given as $X \pm SE$ ($p < 0.001$). The findings show that the co-wewt protocol applied with Pertek Thermal Water may be an effective treatment option in reducing inflammation due to cAd and cAFr.

Keywords: Atopy, cold, dog, water, wet.

Köpek atopik dermatiti ve kütanöz advers gıda reaksiyonlarında eritemi gidermek için soğuk ve ıslak sargı tedavisi

Özet:

Atopik dermatite bağlı inflamasyonlu dokuyu azaltmak için nemlendirilmiş bandajların sıklıkla kullanılması, iyi bilinen eski bir tedavi yöntemidir. Bu çalışma, soğuk ve ıslak bandaj tedavisinin (co-wewt) köpek atopik dermatiti (cAd) ve kütanöz advers gıda reaksiyonları (cAFr) üzerindeki potansiyel terapötik etkilerini değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Epidermal sıcaklık ve eritem skorlarının karşılaştırmalı analizi, co-wewt tedavisinin etkinliğini ve bu tedavi yaklaşımının klinik uygulamalardaki yerini ortaya koymak amacıyla uzman bir grup tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, Pertek Termal Suyu kullanılarak co-wewt, deri dokusu üzerindeki muhtemel soğutma etkisi ve deri inflamasyonundaki hızlı iyileşme nedeniyle hem cAd hem de cAFr'li köpeklerde iyi tolere edilmiştir. Bu durum, $X \pm SE$ olarak verilen, değişmiş epidermal sıcaklık ($33,49 \pm 0,21$ vs $23,62 \pm 0,95$) ve VAS-ESS skoru [$2,25 \pm 0,17$ vs $0,38 \pm 0,13$, sırasıyla birlikte sağaltımdan önce ve sonra] ($p < 0,001$) ile [ADASI $3,25 \pm 0,17$ vs $0,38 \pm 0,13$, sırasıyla birlikte sağaltımdan önce ve sonra] karşılaştırmalı olarak değerlendirilerek desteklenmiştir ($p < 0,001$). Elde edilen bulgular, Pertek Termal Suyu ile uygulanan co-wewt protokolünün, cAd ve cAFr'ye bağlı inflamasyonu azaltmada etkili bir tedavi seçeneği olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Atopi, ıslak, köpek, soğuk, su.

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: uralkerem@gmail.com

How to cite this article: Ural K, Erdoğan H, Erdoğan S & Balıkcı C (2024). Cold and wet wrap therapy for relieving erythema in canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *J. Antakya Vet. Sci.*, 3(2), 27-31.



Introduction

Wet wrap therapy (wwt), has been denoted as a supportive therapeutical non-invasive intervention model through use of a double layer of tubular bandage/gauze, involving a moisty initial inner layer and other relevant dry second outer layer (Devillers and Oranje, 2006). This treatment modality has been preferred frequently, against atopic dermatitis (AD). The Mayo Clinic in USA used and suggested wet dressings nearly 100 years ago against combatting pruritic dermatoses (Bingham et al., 2009; Quinones and Winkelmann, 1967). Apart from several different techniques and small scale case reports were reported between 1970-1980 (Hawkins, 1978; Nicol, 1987), indeed in 30 pediatric AD cases casting 'wet wrap' terminology – suggesting that wwt as a significantly effective therapeutical intervention against acute erythrodermic eczema (Goodyear, 1991). Our researcher group for interest to this subject was aroused following preliminary success with 10-14°C, relatively cold, wwt in several clinical trials almost every Tuesday, which was denoted as wwt. Hence the purpose of the present study was to elucidate the efficacy of co-wwt among dogs with cAd and cAFr.

Material and Methods

Demographic data

In a total of 11, pure-bred (n=6) and crossbred (n=5) client-owned dogs, at the age of 2 to 9 years old, of both sexes (n= 6 male, n=5 female) and various sizes with a diagnosis of cAd (n=7) or cAFr (n=4) on referral to Faculty Clinic to interested researchers participated at this study. Diagnosis of cAd or cAFr were mainly based on relevant literature (Hensel et al., 2015; Favrot et al., 2010; Ural et al., 2020; Ural, 2022). Diagnostic approach was shown in table 1.

Scoring methodology

In an attempt to assess erythema severity dermatological

lesional areas were inspected either 1) with erythema severity scores of 0 to 3 through visual analogue scale (VAS) and named as visual analogue scale erythema severity score (VAS-ESS) as reported firstly (Cugmas and Olivry, 2021), similar to previous denomination (Ural et al., 2023a) or 2) Psoriasis Area and Severity Index (PASI) scores of 0 to 4 and named as Atopic Dermatitis Area and Severity Index (ADASI), similar to previous study (Ural et al., 2023a). The present study was performed taking into account written form of Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals with respecting all animals' rights. Adnan Menderes University Animal Experiments Local Ethics Committee, namely HADYEK report no: 64583101/2018/014 (30/01/2018) was available.

co-wwt therapy module

Natural thermal water (Pertek Thermal Water, Pertek, Türkiye) was the choice of natural treatment modality as because to its unchanged unique and incomparable ingredient without any additives. Chemical composition of Pertek Thermal Water was as follows: 41 °C welding heat with pH=6.53 and selected chemical composition [unit (mg/dL)] of bicarbonate 2025, calcium 366.94, sulphate < 0.1 , magnesium 74.61 and sodium 0.33. This treatment modality was previously used against dog with inflammatory bowel disease and dermatological signs, in which Pertek Thermal Water composition was used (Ural et al., 2023b). Briefly in an attempt to prepare co-wwt therapy module; Pertek Thermal Water was colled down to 10-14°C, and was stabilized between this temperature during bandaging, by use of ice cubes. Bandages were soaked/drenched with this water and then immediately covered to the lesional area (i.e. erythema and alopecia) and left there for 6 minutes. Figure 1 showed selected cases enrolled at this study. The co-wwt therapy was administered twice daily over a period of 10 days. Throughout the treatment, none of the dogs received any form of immunosuppressive or antibiotic therapy,

Table 1. Differentiatl diagnosis and relevant analytes preferred at this study. Apart from diagnostic criteria elimination diet trial was evident. After completion of trial entire dogw were subjected to Virbac Digestive Support Dog Food and Vetexpert Intestinal Dog Food in an altered calendar for at least 6 weeks between switching.

A	B	C	D
Epidermal corneometric analysis [i.e. epidermal hydration and pH] by use of Callegari Soft Plus Device	Dermatosopic examination by DL4 DermLite	Clinical scroign [i.e. CADESI-04 and Vas pruritus]*	Determiation of immunoglobulin (Ig)E by in vivo allergen-specific IgE testing (Polycheck®, German, Turkish side distrbutor RDA Group, Istanbul).



Figure 1. Depicting co-wewt therapy module including Pertek Thermal Water bandaging.

Table 2. Statistically significant alterations in VAS-ESS and ADASI scores before and after co-wewt therapy with Pertek Thermal Water.

	Prior to treatment	After treatment	P value
	$\bar{X} \pm SE$	$\bar{X} \pm SE$	
Skin Temperature (°C)	33.49±0.21	23.62±0.95	0.001
VAS-ESS	2.25±0.17	0.38±0.13	0.001
ADASI	3.25±0.17	0.38±0.13	0.001

ensuring that the observed effects were solely attributable to the co-wewt protocol.

Results

Clinical photographing

Selected case with a severe erythema score prior to and thereafter co-wewt therapy module including Pertek Thermal Water bandaging were shown at figure 2a and 2b. Photographic records were taken 1 week apart prior to and thereafter co-wewt. Erythema scores were diminished. VAS-ESS and ADASI scores were both diminished in 2 cases were shown from data archive.



Figure 2. 2a and 2b showing 2 different cases prior to and thereafter co-wewt therapy module including Pertek Thermal Water bandaging.

VAS-ESS and ADASI scores: clinical interpretation

Results were deemed available at table 2 along with statistical significance. Values were deemed available as $\pm SE$ and p values. Also were shown on table 2 and figure 3a-c; statistically significant alterations among VAS-ESS and ADASI scores were obtained prior to and thereafter co-wewt therapy with Pertek Thermal Water. No adverse reactions were observed in any of the dogs enrolled.

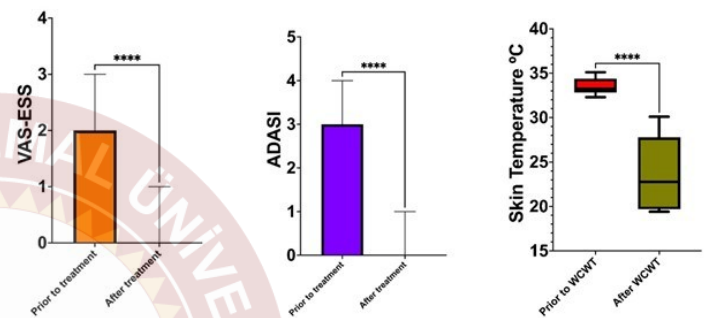
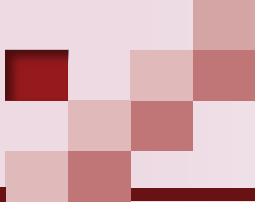


Figure 3. 3a) VAS-ESS and 3b) ADASI scores adopted at this study depicted by boxplot analytes presenting erythema severity. By this way two different diagnostic approach was validated (Cugmas and Olivry, 2021) also was presented previously (Ural et al., 2023).

Discussion

Topical cooling has been preferred commonly as a remedy relieving pruritus. Given cooling a) the intergumentary system through application of cold water, ice, cool compresses or gel usage diminished pruritus for a time among atopic dermatitis patients (Fruhstorfer et al., 1986) and b) diminished or devastated pruritus and cutaneous erythema caused by experimental injection of histamine (Bromma et al., 1995; Fruhstorfer et al., 1986), we herein at this study as a novel strategy both aimed to relieve erythema and pruritus by use of co-wewt among dogs with cAd. Taking in to account erythema interpretation to 2 invalid scoring system, were previously used (Ural et al., 2023a). Relevant clinical scores involving VAS-ESS and ADASI, for remarkable interpretation of erythema, revealed significant differences following co-wewt with Pertek Thermal Water. Hence supportive evidence included [$\pm SE$], altered epidermal temperature (33.49 ± 0.21 vs 23.62 ± 0.95) and VAS-ESS score (2.25 ± 0.17 vs. 0.38 ± 0.13 , prior to and thereafter co-wewt, respectively) ($p < 0.001$) in comparison to (ADASI 3.25 ± 0.17 vs. 0.38 ± 0.13 , prior to and thereafter co-wewt, respectively) ($p < 0.001$). All diminished erythema scores revealed the efficacy of co-wewt with Pertek Thermal Water bandaging, which was took place in our routine practice after completion of our study with satisfactory results.

For anti-itching efficacy of cooling among mice, continuous



cold stimulation is necessary. Interestingly pruritic behavior quickly returned back even if the skin surface was warmed to neighboring temperature (Fruhstorfer et al., 1986). Among TRPM8-deficient mice, the anti-itching efficacy of mild cooling (20° C) were terminated. On the other hand cooling with underneath temperatures i.e. cold ($\leq 17^\circ$ C) diminished itching behavior in TRPM8-deficient mice, denoting that TRPM8-free cold-sensitive tools bestow to thermal sensing at lower temperatures (Liu and Jordt, 2018). Herein at the present study we preferred 10-14° C cold water prepared in ice filled containers and cold water (Pertek Thermal Water), which were then stabilize somewhere between 10-14° C. Also was also evidenced, however not statistically analyzed at the present study co-wewt with Pertek Thermal Water, pruritus was diminished in almost every case involved.

In a prior cohort study wet-wrap therapy was preferred as a therapeutic intervention for moderate-to-severe atopic dermatitis. In this observational cohort study main outcome was improvement in atopic dermatitis severity, established within SCORAD (Scoring Atopic Dermatitis). Through a paired t test, the SCORAD at initial referral and at recovery presented significant alterations in mean \pm SD values, of 49.68 ± 17.72 vs. 14.83 ± 7.45 , respectively ($P < 0.001$) without systemic immunosuppressive therapy, in which solely 31% were received antibiotic. The latter research presented the beneficial wet-wrap therapy as an acute intervention with lasting efficacy 1 month after discontinuing (Nicol et al., 2014). In the present study, during co-wewt with Pertek Thermal Water bandaging the CADESI-04 at admission and at discharge showed diminished values [31-90 to 12-37], respectively for both dogs with cAd cAFr. None of those dogs were receiving any immunosuppressive or antibiotic therapy during the treatment. Nor side effects were observed during co-wewt with Pertek Thermal Water bandaging.

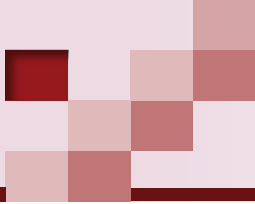
Bacteria gave counter to a quick climatic drop (cold shock) by a temporary/short term debut of cold induced proteins (Graumann and Marahiel, 1996; Phadtare, 2004) and the existance of the latter proteins elevated with the degree of the cold shock (Hébraud and Potier, 1999). Given Escherichia coli several different cold shocked proteins have been recognized i.e. cold shock protein (Csp) family (Yamanaka et al., 1998), and other relevant ones. Cold shock proteins frustrate selected detrimental sequels of climatic deceleration causing aiding cells adaptation (Phadtare, 2004). Following prompt cold shock answering, cold shock protein synthesis diminished whereas other proteins elevated. The latter permitted the cells to grow at low climated, even at a slower

rate (Ermolenko and Makhatadze, 2002). Cold shock proteins were firstly detected among bacteria, in which an immediate declined temperature from 37 °C to 10 °C was capable of elevating 200-fold increase in cold shock protein A exhibition in several few minutes (Gottesmann, 2018; Jones and Inouye, 1994). In the present study although technically and economically (this was self budget Project other then Pertek thermal Water was obtained and freely donated by charitable business man Mr. Selattin SEREFOĞLU), were unable to measure cold shock proteins, declined temperatures for cooling effects obtained at this study could be achieved by both the thermal efficacy/mineral richness of the Pertek Thermal Water and cold shock proteins existed and released from the liver at 10-14° C, preferred. Our subsequent study would be thus aimed at this subject.

Cold shock proteins are under an era of arousing interest, with several beneficial health supportive effects were determined. Given selected cold shock proteins are well recognized assist diminishing inflammation and induce a stress respond among human epidermis (Holland et al 1993), we decided to use this co-wewt by use of Pertek Thermal Water as was well tolerated in both dogs with cAd and cAFr, due to probable cooling effect on the cutaneous tissue and the rapid improvement in skin inflammation. This was supported by altered epidermal temperature, VAS-ESS and ADASI scores, prior to and thereafter co-wewt, respectively] ($p < 0.001$). Clinical cure, as in parallel line with the purpose of this study, relieving of erythema onto the skin, was evident. Investigators of the present research frequently use co-wewt protocol with Pertek Thermal Water for diminishing disease activity against cAd and cAFr, following completion of research. We are keen on developing this treatment modality as an effective non-pharmaceutical support. It has been shown to be a relatively novel (due to cold water enhancement) and effective treatment for cAd. For better understanding and further findings, our subsequent study would thus be aimed to search therapy-resistant cAd and intolerable pruritus to those dogs with unresponsive to multi drug options. Observed and available data of include rapid response to therapy, reduction in itch.

Conclusion

In conclusion, co-wewt therapy using Pertek Thermal Water showed promising effects in reducing inflammation and improving skin condition in dogs with cAd and cAFr. The treatment was well tolerated, and a significant reduction in epidermal temperature, VAS-ESS, and ADASI scores was observed, indicating effective clinical improvement, particularly



in reducing erythema. These findings support the potential of co-wewt therapy as a valuable treatment approach for inflammatory skin conditions in dogs.

The investigators have continued to use the co-wewt protocol following this research, with encouraging results in diminishing disease activity in cAd and cAFr. This non-pharmaceutical treatment modality offers a novel approach that may complement existing therapies. Future studies will aim to evaluate the effectiveness of this protocol in cases of therapy-resistant cAd and severe pruritus unresponsive to conventional treatments, to further understand its potential in challenging clinical scenarios.

Financial Support: There is no financial support for this study.

Ethical Statement: This study was approved by the Adnan Menderes University-HADYEM local ethics committee on 30/01/2018 with number 64583101/2018/014.

Conflict of Interest: There is no conflict of interest in this study.

Author Contributions: Idea, Design: KU; Data collection and/or processing: KU, HE, SE, CB; Analysis and/or commentary: KU, HE, SE, CB; Researching: KU, HE, SE, CB; Writing the article: KU, HE, SE, CB; Critical review: KU, HE, SE, CB.

References

1. Bingham, L. G., Noble, J. W., Davis, M. D. (2009). Wet dressings used with topical corticosteroids for pruritic dermatoses: a retrospective study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 60(5), 792-800. Doi: 10.1016/j.jaad.2008.12.043
2. Bromma, B., Scharein, E., Darsow, U., Ring, J. (1995). Effects of menthol and cold on histamine-induced itch and skin reactions in man. *Neuroscience Letters*, 187(3), 157-160. Doi: 10.1016/0304-3940(95)11362-Z
3. Cugmas, B., Olivry, T. (2021). Evaluation of skin erythema severity by dermatoscopy in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 32(2), 183-e46. Doi: 10.1111/vde.12932
4. Devillers, A. C. A., Oranje, A. (2006). Efficacy and safety of 'wet-wrap' dressings as an intervention treatment in children with severe and/or refractory atopic dermatitis: a critical review of the literature. *British Journal of Dermatology*, 154(4), 579-585. Doi: 10.1111/j.1365-2133.2006.07157.x
5. Ermolenko, D. N., Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59, 1902-1913. Doi: 10.1007/PL00012513
6. Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 23-31. Doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x
7. Fruhstorfer, H., Hermanns, M., Latzke, L. (1986). The effects of thermal stimulation on clinical and experimental itch. *Pain*, 24(2), 259-269. Doi: 10.1016/0304-3959(86)90048-5
8. Goodyear, H. M., Spowart, K., Harper, J. I. (1991). 'Wet-wrap' dressings for the treatment of atopic eczema in children. *British Journal of Dermatology*, 125(6), 604-604. Doi: 10.1111/j.1365-2133.1991.tb14807.x
9. Gottesman, S. (2018). Chilled in translation: adapting to bacterial climate change. *Molecular Cell*, 70(2), 193-194. Doi: 10.1016/j.molcel.2018.04.003
10. Graumann, P., Marahiel, M. A. (1996). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Archives of Microbiology*, 166, 293-300. Doi: 10.1007/s002030050386
11. Hawkins, K. (1978). Wet dressings putting the damper on dermatitis. *Nursing*, 8(2), 64-67. Doi: 10.1097/00152193-197802000-00014
12. Hébraud, M., Potier, P. (1999). Cold shock response and low temperature adaptation in psychrotrophic bacteria. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 211-219.
13. Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 1-13. Doi: 10.1186/s12917-015-0515-5
14. Jones, P. G., Inouye, M. (1994). The cold-shock response—a hot topic. *Molecular Microbiology*, 11(5), 811-818. Doi: 10.1111/j.1365-2958.1994.tb00359.x
15. Liu, B., Jordt, S. E. (2018). Cooling the Itch via TRPM8. *Journal of Investigative Dermatology*, 138(6), 1254-1256. Doi: 10.1016/j.jid.2018.01.020
16. Nicol, N. H. (1987). Atopic dermatitis: the (wet) wrap-up. *AJN The American Journal of Nursing*, 87(12), 1560-1563.
17. Nicol, N. H., Boguniewicz, M., Strand, M., Klinnert, M. D. (2014). Wet wrap therapy in children with moderate to severe atopic dermatitis in a multidisciplinary treatment program. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(4), 400-406. Doi: 10.1016/j.jaip.2014.04.009
18. Phadtare, S. (2004). Recent developments in bacterial cold-shock response. *Current Issues in Molecular Biology*, 6(2), 125-136. Doi: 10.21775/cimb.006.125
19. Quinones, C. A., Winkelmann, R. K. (1967). Changes in skin temperature with wet dressing therapy. *Archives of Dermatology*, 96(6), 708-711. Doi: 10.1001/archderm.1967.01610060102021
20. Ural, K. (2022). Fecal microbiota transplantation capsule therapy via oral route for combatting atopic dermatitis in dogs. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 69(2), 211-219. Doi: 10.33988/auvfd.822971
21. Ural, K., Erdogan, S., Erdoğan, H., Gültekin, M., Gül, G., Türk, E., Arslan, N. (2020). The Good, the Bad and the Ugly Aspects of Atopy in Dogs: Retrospective Study with Multiple Case Series. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 11(1), 18-29. Doi: 10.5336/vetsci.2019-71780
22. Ural, K., Erdoğan, H., & Erdoğan, S. (2023a). Skin Microbiota Transplantation by Nivea Refining Clear-Up Strips Could Reverse Erythema Scores in Dogs with Atopic Dermatitis: Novel Strategy for Skin Microbiome Manipulation: Cohort Study. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 14(1), 11-17. Doi: 10.5336/vetsci.2022-93888
23. Ural, K., Erdoğan, H., Erdoğan, S., Paşa, S. (2023b). Natural Thermal Water Consumption Could be Capable of Improving Gut Mycobiome in Dogs with Inflammatory Bowel Disease and Dermatological Manifestations: Randomized Clinical Study. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 14(1), 1-10. Doi: 10.5336/vetsci.2022-91433
24. Yamanaka, K., Fang, L., Inouye, M. (1998). The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. *Molecular Microbiology*, 27(2), 247-255. Doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00683.x



Araştırma makalesi / Research article

Phylogenetic Analysis and Genetic Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein of Cattle in Burdur Province

Ali Küçük^{1a*}, Özge Sevinç Korkmaz Akar^{1b}, Yakup Yıldırım^{1c}, Kamil Atlı^{1d}

¹ Department of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Burdur Mehmet Akif Ersoy University, Burdur-Türkiye

Phylogenetic Analysis and Genetic Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein of Cattle in Burdur Province

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

14.08.2024

Revizyon/Revised:

16.10.2024

Kabul / Accepted:

09.11.2024

ORCID:

^a 0000-0001-9929-1378

^b 0000-0001-8854-0420

^c 0000-0003-4299-4712

^d 0000-0002-2266-4372

Abstract:

This study aimed to molecularly detect Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) in cattle with clinical signs of respiratory system infection and to conduct a phylogenetic analysis of the detected strains. To detect the pathogen, nasal swab samples collected from 96 cattle were subjected to Reverse Transcriptase – nested PCR using specific primer sets. As a result of the molecular techniques, viral nucleic acid was detected in 2.08% (2/96) of the samples. Additionally, sequence and phylogenetic analyses of the detected local variant were performed and compared with various BRSV strains identified in different regions of Turkey and around the world. The genetic data obtained revealed that the isolates identified in this study belong to Subgroup III, alongside BRSV strains reported from various regions of Turkey, France, and the USA. Immunologically significant point mutations were detected in the immunodominant G glycoprotein region of the variant Asn(N)¹⁷⁹→Asp(D) / Ala(A)²⁰⁵→Thr (T). This result indicates that BRSV strains circulating among cattle can escape the host immune system without losing their pathogenicity and is considered to be one of the important factors that can cause respiratory system infection outbreaks in cattle.

Keywords: Cattle, Bovine Respiratory Syncytial Virus, Reverse Transcriptase – nested PCR, Genetic Characterization

Burdur İlindeki Sığırlarda Bovine Respiratory Syncytial Virus G Glikoproteininin Filogenetik Analizi ve Genetik Karakterizasyonu

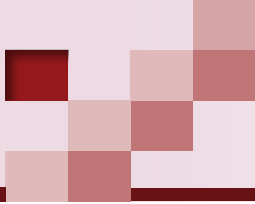
Özet:

Bu çalışmada solunum sistemi enfeksiyonu klinik bulguları gösteren sığırlarda Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV)' un moleküler tespiti ve tespit edilen lokal suşların filogenetik analizlerinin gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Etken tespiti için 96 sığırdan toplanan nazal sürüntü örneklerine spesifik primer setleri kullanılarak Reverz Transkriptaz-nested PCR (RT-nPCR) yöntemi uygulanmıştır. Uygulanan moleküler teknikler sonucunda % 2.08 (2/96) oranında viral nükleik asit tespiti gerçekleştirildi. Bununla birlikte tespit edilen lokal suşların sekans ve filogenetik analizleri gerçekleştirilerek Türkiye ve Dünya'nın farklı bölgelerinden tespit edilmiş farklı BRSV suşları ile karşılaştırmaları yapıldı. Elde edilen genetik verilerden, bu çalışmada tespit edilen izolatların, Türkiye, Fransa ve ABD' nin farklı bölgelerinden bildirilen BRSV suşları ile birlikte, Subgrup III içerisinde yer aldığı belirlenmiştir. Ayrıca izolatların immunodominant G glikoprotein bölgesinde immünojenik açıdan önemli nokta mutasyonları tespit edilmiştir (Asn(N)¹⁷⁹→Asp(D) / Ala(A)²⁰⁵→Thr (T)). Bu sonuç, sığırlar arasında dolaşan BRSV suşlarının patojenitelerini kaybetmeden konak bağışıklık sisteminden kaçabildiklerini ve sığırlarda solunum sistemi enfeksiyon salgınlarına neden olabilecek önemli faktörlerden biri olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Sığır, Bovine Respiratory Syncytial Virus, Reverz Transkriptaz - nested PCR, Genetik Karakterizasyon

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: alikucuk@mehmetakif.edu.tr, alikucuk13@gmail.com

How to cite this article: Küçük A, Korkmaz Akar AS, Yıldırım Y & Atlı K (2024). Phylogenetic Analysis and Genetic Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus G Glycoprotein of Cattle in Burdur Province. *J. Antakya Vet. Sci.*, 3(2), 32-39.



Introduction

Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) is an infection that causes large-scale economic losses to cattle breeders due to reasons such as calf deaths due to severe pneumonia, decrease in milk yield and carcass quality, abortion, reproductive problems and veterinary health expenses (Sermiento-Silva et al., 2012). BRSV one of the major factor that cause this disease complex, is widely seen all over the world due to cattle mobility between countries (Ellis, 2013; Nath et al., 2017). The virus that causes infection, especially in cattle aged 2-6 months, during winter and autumn months, is primarily transmitted by aerosol. On the other hand, it is known that it is indirectly transmitted through contaminated feeders and lickers (Ohlson et al., 2010). Since it is difficult to diagnose the agent using classical clinical diagnostic methods, many laboratory diagnostic techniques such as virus isolation, Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), Enzyme Immuno Assay, Direct Immunofluorescence have been developed (Ellis, 2013; Maclachlan et al., 2017).

According to the taxonomy prepared by International Committee on Taxonomy of Virus, the name of the agent, which was named Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) in the Pneumoviridae family Orthopneumavirus genus until 2015, was changed to Orthopneumovirus bovis after 2016 (Rima et al., 2017; Postler et al., 2021). The virus has an envelope and pleomorphic morphology and negative polarity single-stranded (ss) non-segment RNA genome of approximately 15.2 kb in length. Ten Open Reading Frames (ORFs) on the viral genome encode 11 proteins (3'-NS1-NS2-N-P-M1-SH-G-F-M2.1-M2.2-L-5'). Among these proteins, Small Hydrophobic Protein (SH), Glycoprotein (G) and Fusion Protein (F) are transmembrane glycoproteins its located on the viral envelope. Other proteins are non-structural NS1 and NS2, nucleoprotein (N), phosphoprotein (P), Matrix protein (M), RNA-dependent polymerase protein (L), M 2.1 and M.2.2 proteins (Valacher and Taylor 2007; Ellis, 2013). While Glycoprotein (G), which has an important immunodominant region, is involved in the adsorption of the virus to the host cell surface (Larsen, 2000; Valacher and Taylor, 2007). Genetic characterization and detected to heterogeneity of BRSV isolates were performed by phylogenetic analysis of G, N and F genomic regions (Langedijk et al., 1997; Valacher et al., 2000). Studies on the sequence of the G glycoprotein region have revealed that BRSV is genetically divided into ten (I-X) subgroups, and studies using monoclonal antibodies have

revealed that the agent has four serotypes (A, B, AB, untyped) (Klem et al., 2014; Kumagai et al., 2021).

This study aimed to molecular diagnosis of BRSV and determined its etiological role in cattle respiratory system infections. The G glycoprotein region, which is an important immunodominant region responsible for the adsorption of the virus to the susceptible cell, was analyzed in this study to evaluate the cellular infection of the virus. In addition, it was aimed to amplify the G glycoprotein region of the detected local isolates and sequence analysis, thus determining the subtypes of BRSV strains circulating among cattle in the region, their phylogenetic characterization and their differences with other strains.

Material and Method

Animals Used in the Study and Sampling

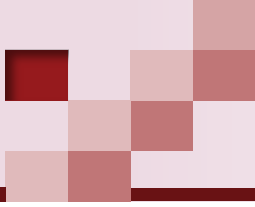
In the study, nasal swap samples were obtained from 96 nonvaccinated cattle of different breeds, ages and genders with clinical signs of respiratory system infection (dyspnea, mucopurulent nasal discharge, conjunctival discharge) and fever > 40°C. Samples were collected by random sampling method, constituting 10% of the number of infected animals from four different cattle herds. Three of the ranches where the samples were collected are combined animal breeding and one is dairy cattle breeding.

The general characteristics of the animals that constitute the

Table 1. General characteristics of the sampled animals

Data of Sampled Animals	n (%)
Number of Animals Sampled	96 (%100)
Age	
< 9 months	30 (%31.25)
10-24 months	43 (%44.79)
> 24 months	23 (%23.95)
Gender	
Female (♀)	43 (%45.8)
Male (♂)	53 (%55.2)
Breed	
Simmental	66 (%68.75)
Holstein	30 (%31.25)

Nasal swap samples obtained from animals were placed in transport tubes containing penicillin (500 IU/mL) + streptomycin (20 mg/mL) and Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 1.5 mL) and brought to the diagnostic laboratory in accordance with the cold chain protocol.



Extraction of the viral nucleic acid

Total RNA extraction from nasal swab samples was performed by the acid-guanidine-phenol method (Rio et al., 2010). The samples brought to the laboratory were thoroughly vortexed and then centrifuged at 3000 rpm +4°C for 20 minutes. After centrifugation, 250 µL of supernatant was taken into RNase/DNase free microcentrifuge tubes (2mL) and 750 µL of Hibrizol (Hibrigen/Türkiye) was added and stored at -80°C until the extraction stage. Total RNA extraction was carried out as specified by the manufacturer, and after extraction, the lyophilized RNA was rehydrated with 55-60 µL of DEPC water and stored at -80°C until the complementary DNA (cDNA) stage.

Reverse transcription-nPCR

Before the PCR, viral cDNA synthesis was performed from viral RNA using the iScript cDNA synthesis kit (Biorad, USA, Cat No: 1708891). cDNA synthesis was performed as specified by the manufacturer. G glycoprotein region of BRSV were amplified using the RT-nPCR technique. Amplifications were performed with gene-specific oligonucleotide primers and PCR conditions reported by Vilcek et al. (1994). Gel electrophoresis method was used to observe the amplicons. PCR amplicons of the samples were run on a 1.5% agarose gel at 90V for 1 hour and visualized under UV light with the utilization of a transilluminator. Information about oligonucleotide primers, gene regions and amplicon sizes is given in Table 2.

Table 2. G glycoprotein oligonucleotide primers used in RT-nPCR (Vilcek et al., 1994)

BRSV G	B5A	CCACCCTAGCAATGATAACCTTGAC	603 ^{1st}
	B6A	AAGAGAGGATGC(T/C)TTGCTGTGG	
	B7A	CATCAATCAAAGCACCACACTGTC	371 ^{2nd}
	B8	GCTAGTTCTGTGGTGGATTGTTGTC	

Sequencing

With the outsourcing bi-directional (Forward and Reverse primers) sequence analysis performed of the amplicons showing the clearest band image after gel electrophoresis with the Sanger sequencing method (Letgen, Türkiye). Sequence data were assembled and edited using Aliview 1.27 sequence analysis software (Larsson, 2014). The edited sequence data were compared to the nucleotide sequence database using the Basic Local Alignment Search Tool, a module of the National Center of Biotechnology Information. Phylogenetic

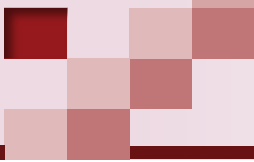
analyses of G gene sequence were carried out with the MegaX software program based on the maximum likelihood method using the Tamura 3 model (Kumar et al., 2018). The confidence level of the Maximum Likelihood tree was determined as 1000 bootstrap. Evolutionary closeness between isolates were determined with Sequence Demarcation Tool v. 1.2 (SDT) software. Sequences were recorded in the GenBank database and accession numbers were obtained.

Results

As a result of the RT-nPCR technique performed using primers specific to G glycoprotein region, the presence of nucleic acid belonging to BRSV was detected in two of the ninety-six nasal swap samples. The animals from which the samples were obtained, in which the BRSV genome was detected, were younger than 9 months old and with clinical signs of acute respiratory tract infection. In addition, it was determined that the animals in which the causative agent was detected were in an enterprise where combined animal breeding was carried out.

The sequences reported in this article were submitted to the GenBank, with accession numbers as follows OR797906 and OR797907 for G gene.

Partial sequencing G glycoprotein region of the our BRSV isolates in our research was performed and phylogenetic analyzes were performed. In this context, BRSV subgroups of our local BRSV isolates were identified and their genetic similarities with strains isolated from Türkiye and other countries and nucleotide/amino acid differences on their partial genomes were revealed. Our phylogenetic analysis on the gene region coding the G protein revealed that our Burdur/BRSV NS/13 and Burdur/BRSV NS/14 strains were included in BRSV Subgroup III, together with BRSV strains isolated from England, Belgium, France and Türkiye. In this study, the nucleotide similarity rate between our two local strains was determined to be 98.8%. In contrast, the nucleotide similarities of our strains to those with accession numbers MW881234-MW881233, identified in Afyonkarahisar, and MH133326-MH133327, identified in Eskişehir, were found to be approximately 88-89%. Meanwhile, the similarity rates to the strains with accession numbers MW711876-MW711875, isolated in Hatay, and MW892047, detected in Izmir, were determined to be around 92-93%. On the other hand, the similarity was found to be 85.2-85.8% with the strains identified in France with accession numbers AF188579-



AF188581, and 89.9% with the BRSV strain identified in Belgium with accession number U24716. Additionally, a similarity of 86.4% was revealed with the strain identified in England with accession number M58307. On the other hand, the similarity between our field strains and a vaccine isolate, L27802, was revealed as 86.7%.

The phylogenetic tree created based on the G protein-coding gene region is shown in figure 1. In additionally, the similarity rates of the G Glycoprotein region of BRSV are given in figure 2.

G protein amino acid sequences of Burdur/BRSV NS/13 and Burdur/BRSV NS/14 isolates were compared with BRSV strains isolated from different countries and Türkiye, and it was determined that both isolates preserved four cystine residues in the immunodominant region.

However, as a result of point mutations in the genomes of both isolates, it was determined that the amino acids Asn¹⁷⁹ → Asp and Ala²⁰⁵ → Thr were synthesized. On the other hand, mutations were detected in the YKST⁹⁸ → CGGL amino acid motifs and it was revealed that another cystine residue was formed in both isolates. The motif mutation detected in Burdur/BRSV NS/13 and Burdur/BRSV NS/14 strains was not found in BRSV field and vaccine strains in different subgroups detected in Türkiye and around the world. On the other hand, point mutations were detected in the form of Ser⁹⁷-Leu in the strain with accession number KY753456 in Subgroup II and Lys⁹⁶-Glu in the strain with accession number AF188585 in Subgroup VI.

The differences between the G amino acid sequences of BRSV isolates are shown in figure 3.

Discussion

BRSV, one of the main causes of BRDC, which is among the multifactorial diseases of cattle, is widespread in the world. It causes producers to happen large-scale economic losses, especially in large herds, directly due to deaths due to pneumonia and bronchopneumonia, and indirectly through abortion, decrease in carcass quality, and prophylactic expenses (Küçük and Yıldırım, 2022).

In this study, molecular diagnosis of BRSV, one of the major viral pathogens causing BRDC, performed the conventional RT-nPCR technique, and phylogenetic characterization of the Glycoprotein region encoding G protein was carried out. Studies on the virology and serological detection of BRSV have shown that the agent is circulating in different species in many countries in Europe, Asia and the South America (Yaegashi et al., 2005; Socha et al., 2009; Kresic et al., 2018; Leme et al., 2020). Likewise, in studies conducted using different diagnostic methods in Türkiye, the prevalence of the agent in cattle was reported to be between 0.9% and 40% (Yaman et al., 2018; Timurkan et al., 2019; Karayel-Hacıoğlu et al., 2019; Yazıcı et al., 2020; İnce et al., 2022). In this study, we determined the prevalence of BRSV in cattle in the research area as 2.08% (2/96). Our prevalence value is parallel to other research results. According to phylogenetic analysis, we determined that our field isolates were included in BRSV Subgroup III, along with BRSV strains isolated from Türkiye, France and the USA. In

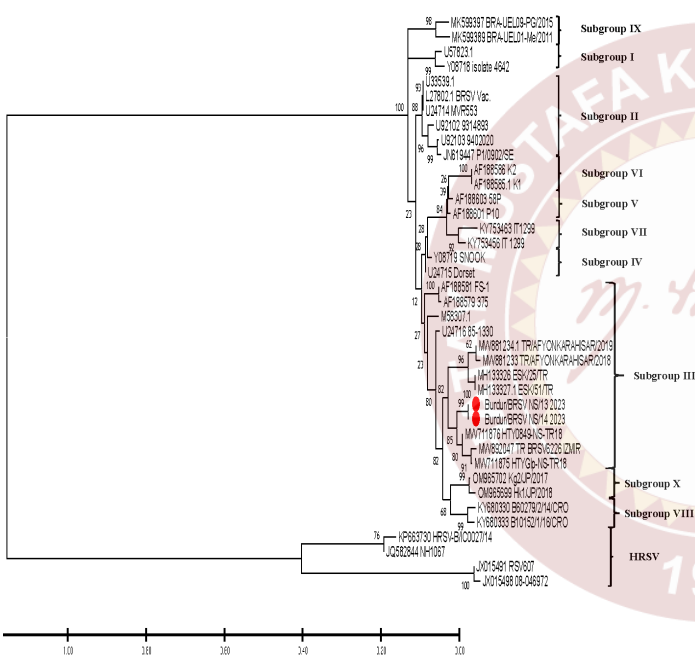


Figure 1. Phylogenetic tree of G gene; red circles indicate strains local strain in this study

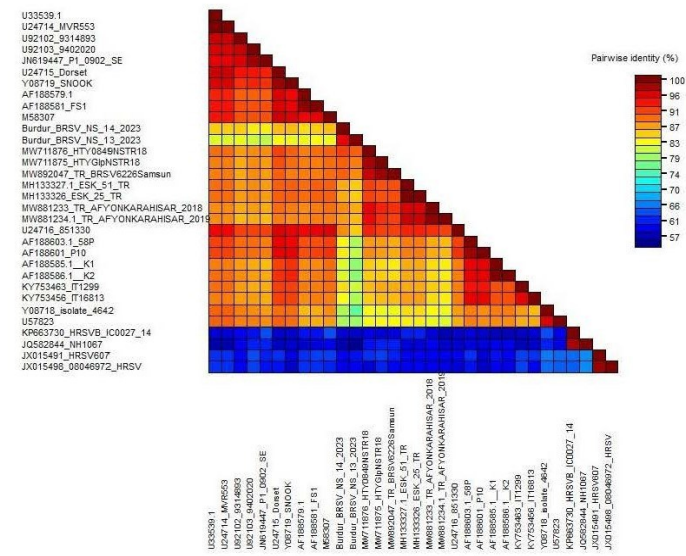


Figure 2. The sequence demarcation tool (SDT) results of G gene



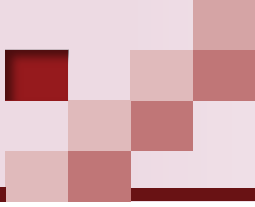
Figure 3. The aminoacids differences between BRSV strains isolated in the study and accessed via GenBank

our research, results similar to the studies conducted on the phylogenetic analysis of BRSV in different regions of Türkiye were obtained and it was revealed that BRSV Subgroup III was in circulation in cattle in Türkiye. Although it was reported that BRSV had a single genotype in the first years when it was detected, with the development of monoclonal antibody techniques and phylogenetic analysis, subtypes with low-grade genetic differences began to be detected (Valarcher et al., 2000) However, it has been suggested that there is a geographical correlation between BRSV subgroups and the regions where they are detected (Yaegashi et al., 2005). In studies which molecular diagnosis and phylogenetic analysis of BRSV were carried out, BRSV subgroup II was detected in Scandinavian countries, while BRSV Subgroups I, II, III, IV, V, VI were found to be widespread in Western and Southern Europe (Valarcher et al., 2000; Bidokhti et al., 2012; Klem et al., 2014; Bertolotti et al., 2018). In addition, in phylogenetic studies conducted in South America, Subgroup I in Brazil (Spilki et al., 2006); In studies conducted in Asian countries and Türkiye Subgroup III was reported in China and Subgroup X was reported in Japan (Chang et al., 2022; Mitarai et al., 2023). Therefore, the hypothesis that there is a geographical

correlation between BRSV subgroups and the regions where they are detected is weakened. On the other hand, it is thought that the reason why BRSV isolates in the same subgroup were detected in molecular and phylogenetic analyzes carried out in countries that are geographically distant from each other may be due to the increase in live animal imports between countries with the development of transportation technologies.

The G glycoprotein in the structure of BRSV, depending on the BRSV isolates, is a type II glycoprotein with 257-263 amino acids and an anchor domain of 38-66 amino acids. In additionally, the genomic region is important for immunization because it contains a cysteine-rich immunodominant region between amino acids 174-188, which is the central binding site of neutralizing antibodies (Valarcher et al., 2000; Valarcher and Taylor, 2007).

Langedijk et al. (1997) genetic research on the antigenic structure of the central conserved domain of the G protein of BRSV has been revealed that a change in amino acid sequences 177. and 180. can only cause a local change on the antigenic surface, whereas mutations in positions 183. and



184. can lead to major structural changes. On the other hand, they reported that point mutations in the 180. and 205. amino acid regions played an important role in the preliminary classification of BRSV subgroups. Leme et al. (2020) performed genetic analysis of the F and G genomic regions in BRSV isolates isolated from cattle in Brazil and detected mutations in the cystine residues in the immunodominant region between 170 and 190. On the other hand, many studies have reported that the cysteine-rich immunodominant region located in the central hydrophobic region (CHR; aa 158-189) of the G protein of BRSV isolates is preserved, but point mutations are observed in regions 179 and 205 (Kresic et al., 2018; Karayel-Hacıoğlu et al., 2019; Kumagai et al., 2021; Jia et al., 2021; İnce et al., 2022). In the G protein amino acid sequences of the two BRSV isolates we obtained in this study, it was determined that four cystein residues in the immunodominant region were preserved, similar to the results of previous research. However, Leme et al. (2020) found that different amino acid residues were synthesized instead of the four cystein residues in the BRSV isolates they isolated. Point mutations in the 180. and 205. amino acid regions play an important role in determining BRSV subgroups. However, especially the change in the amino acids Ala²⁰⁵ → Thr allows the virus to escape from the host immune system (Langedijk et al., 1997; Valarcher et al., 2000).

Karayel-Hacıoğlu et al. (2019) and İnce et al. (2022) detected the amino acid as Iso²⁰⁵ in the BRSV strains they isolated. On the contrary, the change in the Burdur/BRSV NS/13, Burdur/BRSV NS/14 strains isolated in this study and the BRSV strains detected in Hatay was determined to be Thr²⁰⁵. It is thought that these circulating isolates may increase the prevalence of BRSV infection in the region by escaping the immune system developed against the agent in cattle populations.

In the light of this datas, it was evaluated that the BRSV isolates we detected preserved their pathogenicity under in vivo conditions. However, it was concluded that research on this situation should be increased by performing analyzes of BRSV isolates isolated from different regions.

It is known that BRSV causes severe bronchopneumonia in the postnatal period between 2 and 6 months of age. Therefore, the vaccine against the pathogen must have a strong immunostimulatory effect during the first months of life (Valacher and Taylor 2007) Inactivated vaccines (β -propiolactone-inactivated, formalin-inactivated), live vaccines obtained through biotechnological methods (NS deletion mutant, FCS-2 cleavage mutant, SH deletion mutant), and recombinant live vaccines (G protein mutant) have been

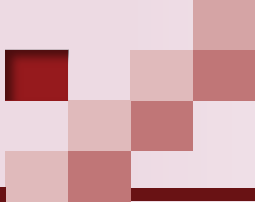
developed for disease prevention (Scheiber et al., 2000). Studies involving live vaccines produced using G protein deletion have shown that, when experimentally inoculated intranasally in calves, appropriate attenuation of the pathogen was achieved, and neutralizing antibody titers were elevated. However, it has been noted that the serum antibody titers developed due to vaccination were 4-32 times lower than those formed by field strains. On the other hand, although attenuated recombinant BRSV vaccines are considered promising for protection against infection, the divergence of the vaccine virus from the original BRSV field strain due to point mutations and the risk of the virus regaining virulence through serial passage in cell cultures remains a concern (Schmidt et al., 2002).

As a result, in this study, molecular diagnosis made by the RT-nPCR method using primer sets specific to the G Glycoprotein region of BRSV in nasal swap samples obtained from cattle with clinical signs of respiratory system infection. The local BRSV strains we isolated of our research were sequenced and phylogenetic analyzes. As a result of the genetic analysis, differences were detected in the gene region affecting the immunogenicity and pathogenicity of our isolates in Subgroup III. Although there are many studies on virological and serological detection of BRSV, there are a limited number of studies on phylogenetic analysis and revealing the genetic differences of detected local isolates with different BRSV strains. Phylogenetic analysis of BRSV, genetic comparisons with other strains and revealing genome changes in local isolates will shed light on future research on determining the immunological/pathogenic effects of these mutations on isolates. Even, it is concluded that it can provide an infrastructure for genotype-specific vaccine research prepared with local strains that may be needed in the future and pave the way for the development of different diagnostic techniques.

Financial Support: The authors did not receive support from any organization for the submitted work.

Ethical Statement: Approval was obtained from the animal testing local ethics committee of Burdur Mehmet Akif Ersoy University. The procedures used in this study adhere to the tenets of the Declaration of Helsinki (MAKU-HADYEK 1045/2023)

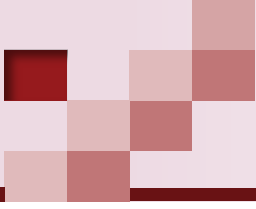
Conflict of Interest: The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.



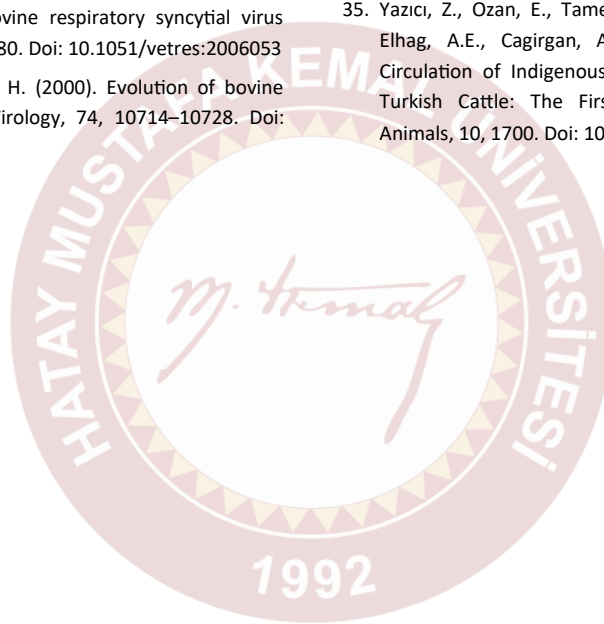
Author Contributions: AK: Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation. YY: Methodology, Investigation, Data curation. Methodology, Investigation. KA: Writing – original draft, Investigation. ÖSKA: Writing – original draft, Investigation, Methodology.

References

- Bertolotti, L., Giammarioli, M., & Rosati, S. (2018). Genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus strains isolated in Italy: evidence for the circulation of new divergent clades. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 30, 300-304. Doi: 10.1177/1040638717746202.
- Bidokhti, M.R.M., Traven, M., Ohlson, A., Zarnegar, B., Baule, C., Belak, S., Alenius, S., & Liu, L. (2012). Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial viruses from recent outbreaks in feedlot and dairy cattle herds. *Archives of Virology*, 157, 601-607. Doi: 10.1007/s00705-011-1209-3
- Chang, Y., Yue, H., & Tang, C. (2022). Prevalence and molecular characteristics of bovine respiratory syncytial virus in beef cattle in China. *Animals*, 12, 3511. Doi: 10.3390/ani12243511
- Ellis, J. (2013). Bovine respiratory syncytial virus. In: Munir M. (ed), *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Pathobiology and Molecular Diagnosis* (pp.117-140). CPI Group.
- İnce, Ö.B., Şevik, M., Özgür, E.G., & Sait A. (2022). Risk factors and genetic characterization of bovine respiratory syncytial virus in the inner Aegean Region, Turkey. *Tropical Animal Health and Production*, 54, 4. Doi: 10.1007/s11250-021-03022-5.
- Jia, S., Yao, X., Yang, Y., Niu, C., Zhao, Y., Zhang, X., Pan, R., Jiang, X., Xiaobo, S., Qiao, X., Guan, X., & Xu, Y. (2021). Isolation, identification, and phylogenetic analysis of subgroup III strain of bovine respiratory syncytial virus contributed to outbreak of acute respiratory disease among cattle in Northeast China. *Virulence*, 12, 404-414. Doi: 10.1080/21505594.2021.1872178
- Karayel-Hacıoğlu, I., Coşkun, N., Duran-Yelken, S., Sevinç, S., & Alkan, F. (2019). Phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus from calves with respiratory disorders. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 25, 251-256. Doi: 10.9775/kvfd.2018.20819
- Klem, T.B., Rimstad, E., & Stokstad, M. (2014). Occurrence and phylogenetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in outbreaks of respiratory disease in Norway. *BMC Veterinary Research*, 10, 15. Doi: 10.1186/1746-6148-10-15
- Kresic, N., Bedekovic, T., Brnic, D., Simic, I., Lojkic, I., & Turk, N. (2018). Genetic analysis of bovine respiratory syncytial virus in Croatia. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 58, 52-57. Doi: 10.1016/j.cimid.2018.09.004.
- Kumagai, A., Kawauchi, K., Andoh, K., & Hatama, S. (2021). Sequence and unique phylogeny of G genes of bovine respiratory syncytial viruses circulating in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33, 162-166. Doi: 10.1177/1040638720975364.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). Mega X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.
- Küçük, A., & Yıldırım, Y. (2022). Antigenic and histopathologic evaluation, with molecular characterization and identification of BPIV3 in cattle with respiratory system infections. *Large Animal Review*, 28, 123-130.
- Langedijk, J.P.M., Meloen, R.H., Taylor, G., Furze, J.M., & van Oirschot, J.T. (1997). Antigenic structure of the central conserved region of protein G of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 71, 4055-4061. Doi: 10.1128/JVI.71.5.4055-4061.1997.
- Larsen, L.E. (2000). Bovine respiratory syncytial virus (BRSV): a review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 41, 4055-4061. Doi: 10.1186/BF03549652.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30, 3276-3278. Doi: 10.1093/bioinformatics/btu531
- Leme, R.A., Agnol, A.M.D., Balbo, L.C., Pereira, F.L., Possatti, F., Alfieri, A.F., & Alfieri, A.A. (2020). Molecular characterization of Brazilian wild-type strains of bovine respiratory syncytial virus reveals genetic diversity and a putative new subgroup of the virus. *Veterinary Quarterly*, 40, 83-96. Doi: 10.1080/01652176.2020.1733704
- Maclachlan, N.J., Dubovi, E.J., Barthold, S.W., Swayne, D.E., & Winton, J.R. (2017). *Paramyxoviridae and Pneumoviridae*. In: Maclachlan NJ, Dubovi EJ (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology* 5th ed. (pp. 327-356.). Elsevier Inc. Doi: 10.1016/B978-0-12-800946-8.00017-9Get rights and content
- Mitarai, S., Okuya, K., Miyane, K., Miyamoto, M., Ishikawa, S., Kawaguchi, H., Hatazoe, I., Suda, Y., Arima, E., Nakazato, H., Hobo, S., Matasani, T., & Ozawa, M. (2023). Genetic characterization of bovine respiratory syncytial viruses in Japan between 2017 and 2019. *Archives of Virology*, 168, 51. Doi: 10.1007/s00705-022-05670-w.
- Nath, S.R., Keshaw, T., Samantha, W., McKayla, D.V., Cassandra, T.W., & Claude, D. (2017). Detection of antibodies against bovine respiratory syncytial virus in ruminants of Grenada, West Indies. *Journal of Animal Research*, 7, 223-226. Doi: 10.5958/2277-940X.2017.00033.X
- Ohlson, A., Emanuelson, U., Traven, M., & Alenius, S. (2010). The relationship between antibody status to bovine corona virus and bovine respiratory syncytial virus and disease incidence, reproduction and herd characteristics in dairy herds. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 37. Doi: 10.1186/1751-0147-52-37
- Postler, T.S., Brown, P.A., Buchholz, U.J., de Swart, R.L., Drexler, J.F., Duprex, P.W., Easton, A.J., Li, J., Spann, K.M., Thornburg, N.J., van den Hoogen, B., Williams, J.V., & Kuhn, J.H. (2021). Rename all species in the family to comply with the ICTV-mandated binomial format (Mononegavirales: Pneumoviridae). *ICTV*, Access Date: 14.10.2024. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202301650&taxon_name=Orthopneumovirus%20bovis
- Rima, B., Collins, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R.A., Lee, B., Maisner, A., Rota, P., & Wang, L. (2017). *ICTV Virus Taxonomy Profile: Pneumoviridae*. *Journal of General Virology*, 98, 2912-2913. Doi: 10.1099/jgv.0.000959.
- Rio, D.C., Ares Jr, M., Hannon, G.J., & Nilsen T.W. (2010). Purification of RNA Using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb Protoc*. Doi: 10.1101/pdb.prot5439.
- Schmidt, U., Breyer, J., Polster, U., Gershwin, L.J., & Buchholz, U. (2002). Mucosal immunization with live recombinant bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and recombinant BRSV lacking the envelope glycoprotein G protects against challenge with wild-type BRSV. *Journal of Virology*, 76, 12355-12359.
- Schreiber, P., Matheise, J.P., Dessy, F., Heimann, M., Letesson, J.J., Coppe, P., & Collard, A. (2000). High mortality rate associated with bovine respiratory syncytial virus (BRSV) infection in Belgian white blue calves previously vaccinated with an inactivated vaccine. *Journal of Veterinary Medicine B Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 47, 535-550. Doi: 10.1046/j.1439-0450.2000.00380.x
- Sermiento-Silva, R.E., Nakamura-Lopez, Y., & Vaughan, G. (2012). *Epidemiology, molecular epidemiology and evolution of bovine*



- respiratory syncytial virus. *Viruses*, 4, 3452-3467. Doi: 10.3390/v4123452.
27. Socha, W., Larska, M., & Rola, J. (2009). Molecular characterisation of the first polish isolates of bovine respiratory syncytial virus. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 53, 569-574.
28. Spilki, F.R., Almeida, R.S., Domingues, H.G., D'Arce, R.C.F., Ferreira, H.L., & Campalans, J. (2006). Phylogenetic relationships of Brazilian bovine respiratory syncytial virus isolates and molecular homology modeling of attachment glycoprotein. *Virus Research*, 116, 30-37. Doi: 10.1016/j.virusres.2005.08.010.
29. Timurkan, M. O., Aydin, H., & Sait, A. (2019). Identification and molecular characterisation of bovine parainfluenza virus-3 and bovine respiratory syncytial virus-first report from Turkey. *Journal of Veterinary Research*, 63 (2), 167-173.
30. Valarcher, J.F., & Taylor, G. (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection. *Veterinary Research*, 38, 153-180. Doi: 10.1051/vetres:2006053
31. Valarcher, J.F., Schelcher, F., & Bourhy, H. (2000). Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *Journal of Virology*, 74, 10714-10728. Doi: 10.1128/jvi.74.22.10714-10728.2000.
32. Vilcek, S., Elvander, M., Ballagi-Pordany, A., & Belak, S. (1994). Development of nested PCR assays for detection of bovine respiratory syncytial virus in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 2225-2231. Doi: 10.1128/jcm.32.9.2225-2231.1994
33. Yaegashi, G., Seimiya, Y.M., Seki, Y., & Tsunemitsu, H. (2005). Genetic and antigenic analyses of bovine respiratory syncytial virus detected in Japan. *The Journal of Veterinary Medicine Science*, 67, 145-150. Doi: 10.1292/jvms.67.145.
34. Yaman, T., Büyükbayram, H., Özyıldız, Z., Terzi, F., Uyar, A., Keles, Ö.F., Özsoy, Ş.Y., & Yener, Z. (2018). Detection of bovine respiratory syncytial virus, *pasteurella multocida*, and *mannheimia haemolytica* by immunohistochemical method in naturally-infected cattle. *Journal of Veterinary Research*, 62, 439-445. Doi: 10.2478/jvetres-2018-0070.
35. Yazıcı, Z., Ozan, E., Tamer, C., Muftuoglu, B., Barry, G., Kurucay, H.N., Elhag, A.E., Cagirgan, A.A., Gumusova, S., & Albayrak, H. (2020). Circulation of Indigenous Bovine Respiratory Syncytial Virus Strains in Turkish Cattle: The First Isolation and Molecular Characterization. *Animals*, 10, 1700. Doi: 10.3390/ani10091700.



Araştırma makalesi / Research article

Evaluation of the alterations in some blood biochemical parameters and minerals during gestation period in *Damascus* goats

Serkan İrfan KÖSE^{1a*}, Ece Koldaş ÜRER^{2b}, Ayşe Merve KÖSE^{2c}¹ Department of Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, 31060, Hatay, Türkiye.² Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Veterinary Medicine, Hatay Mustafa Kemal University, 31060, Hatay, Türkiye.Evaluation of the alterations in some blood biochemical parameters and minerals during gestation period in *Damascus* goats

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

13.11.2024

Revizyon/Revised:

02.12.2024

Kabul / Accepted:

19.12.2024

ORCID'S:

^a 0000-0003-3189-6690^b 0000-0002-9631-8501^c 0000-0003-1863-5955

Abstract:

The health of goats can be accurately predicted by examining their mineral and biochemical profiles. Numerous factors, including the environment, management techniques, gender, age, breed, season, and physiological phases of reproduction, might have an impact on these profiles. Hence, this study investigated the alterations in the metabolic profile of *Damascus* goats before pregnancy, during gestational, and postpartum period. For this purpose, twelve *Damascus* goats, bearing single fetuses, aged 3-6 years with an average weight of 40-60 kg, selected from a herd of multiparous goats in which pregnancy was obtained by estrus synchronization, were used in the study. The blood samples of that goats were collected five times from the jugular vein: before synchronization (BS), during pregnancy [55th (early pregnancy; EP), 95th (mid-pregnancy; MP), and 135th (late pregnancy; LP) days], and after parturition (PP). In blood samples, AST(SGOT) U/L, GGT U/L, BUN mg/dL, Glucose mg/dL, Cholesterol mg/dL, Total Protein g/dL, Albumin/dL, Globulin g/dL, Albumin to Globulin ratio, Calcium g/dL, Magnesium g/dL and Phosphorus g/dL concentrations were measured the evaluation of the metabolic profile. AST levels were found to be higher in all other periods (early, mid, and late pregnancy and postpartum) except before synchronization. A notable decrease in serum GGT levels after synchronization and a gradual increase, including during the gestation and postpartum periods, were detected. The different levels of blood urea nitrogen were determined in all pregnancy periods, with the highest level being detected in the MP period. In the MP period, contrary to other gestation periods, both glucose and cholesterol levels were observed to be higher. The concentration of blood proteins was observed to be markedly diminished during the LP period. Serum Ca levels increased in EP compared to BS, while the difference in Ca levels throughout pregnancy did not change statistically significantly. Serum magnesium levels exhibited a regular increase throughout the course of pregnancy. Serum P levels were found to be lower during MP. The study results indicated that cholesterol, phosphorus, albumin, and AST are the most noticeably altered parameters in the mid-pregnancy period, while blood urea nitrogen, glucose, calcium, and magnesium are the parameters more significantly altered in the postpartum period. Accordingly, it was concluded that monitoring the metabolic profile of pregnant *Damascus* goats from mid-pregnancy to the postpartum period may be useful in preventing possible metabolic problems.

Keywords: *Damascus* Goats; Metabolic Profile; Pregnancy

Şam keçilerinde gebelik süresince bazı kan biyokimyasal parametreleri ve minerallerindeki değişikliklerin değerlendirilmesi

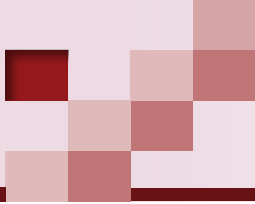
Özet:

Keçilerin sağlığı, mineral ve biyokimyasal profillerinin incelenmesiyle doğru bir şekilde tahmin edilebilir. Çevre, yönetim teknikleri, cinsiyet, yaş, ırk, mevsim ve üreme sürecinin fizyolojik evreleri dahil olmak üzere çok sayıda faktör bu profiller üzerinde etkili olabilir. Bu nedenle, bu çalışmada gebelik öncesi, gebelik ve doğum sonrası dönemlerde Şam keçilerinde metabolik profildeki değişiklikler araştırıldı. Bu amaçla çalışmada, östrus senkronizasyonu ile gebelik elde edilen multipar keçilerden oluşan bir sürüden seçilen, 3-6 yaş arası, ortalama 40-60 kg ağırlığında, tek fötüs taşıyan 12 Şam keçisi kullanıldı. Keçilerden juguler ven'den senkronizasyondan önce, gebelik sırasında [55. (erken gebelik), 95. (orta gebelik) ve 135. (geç gebelik) gün] ve doğumdan sonra olmak üzere beş kez kan örnekleri alındı. Kan örneklerinde AST(SGOT) U/L, GGT U/L, BUN mg/dL, Glukoz mg/dL, Kolesterol mg/dL, Toplam Protein g/dL, Albümin/dL, Globulin g/dL, Albümin/Globulin oranı, Kalsiyum g/dL, Magnezyum g/dL ve Fosfor g/dL konsantrasyonları metabolik profilin değerlendirilmesi amacıyla ölçüldü. AST düzeylerinin senkronizasyon öncesi hariç diğer tüm dönemlerde (erken, orta, geç gebelik ve doğum sonrası) daha yüksek olduğu görüldü. Senkronizasyondan sonra serum GGT düzeylerinde belirgin bir azalma, gebelik ve doğum sonrası dönemleri de kapsayan kademeli bir artış tespit edildi. Kan üre azotu düzeyleri tüm gebelik dönemlerinde farklı düzeylerde saptandı, en yüksek düzey orta gebelik döneminde tespit edildi. Bu dönemde diğer gebelik dönemlerinden farklı olarak hem glukoz hem de kolesterol düzeyi daha yüksek izlendi. Geç gebelik döneminde kan proteini konsantrasyonunun belirgin olarak azaldığı izlendi. Serum kalsiyum düzeyleri erken gebelikte senkronizasyon öncesine kıyasla artarken, gebelik boyunca kalsiyum düzeyleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde değişmedi. Serum magnezyum düzeyleri gebelik boyunca düzenli bir artış gösterdi. Serum fosfor düzeylerinin orta gebelikte daha düşük olduğu bulundu. Çalışma sonuçları, kolesterol, fosfor, albümin ve AST'nin gebelik ortasında belirgin şekilde değişen parametreler olduğunu, kan üre azotu, glikoz, kalsiyum ve magnezyumun ise doğum sonrası dönemde daha fazla değişen parametreler olduğunu gösterdi. Buna göre, gebe Şam keçilerinin metabolik profilinin gebelik ortasından doğum sonrası döneme kadar izlenmesinin olası metabolik sorunları önlemede yararlı olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar kelimeler: Gebelik; Metabolik Profil; Şam Keçileri

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: serkanirfankose@mku.edu.tr

How to cite this article: Köse Sİ, Koldaş Ürer E & Köse AM (2024). Evaluation of the alterations in some blood biochemical parameters and minerals during gestation period in *Damascus* goats. *J. Antakya Vet. Sci.*, 3(2), 40-49.



Introduction

Small ruminant husbandry is a sector that contributes to the environment through the consumption of agricultural residues, mostly practiced in rural areas, and also plays an important role economically by providing income and employment (Mansour et al., 2024). Goats are among the most valuable animals to people all across the world (Bamerny et al., 2022). The ability of goats to adapt to diverse climatic conditions in tropical and subtropical regions is a defining characteristic that enables them to efficiently utilize low-quality forage and thrive in the most challenging environments (Bamerny et al., 2022; Mansour et al., 2024).

Blood biochemical parameters assist in the determination of energy, protein, enzymatic, hormonal, and mineral profiles, as well as the objective evaluation of the nutritional status, milk production, and health status of animals (Waziri et al., 2010; Rawat et al., 2021). In addition, blood biochemical measures such as free fatty acids, total serum protein, triglycerides and urea are useful indicators of an animal's nutritional and health status (Gupta et al., 2007; Bamerny et al., 2022). Cholesterol serves a critical metabolic function as a precursor for steroid hormones, bile acids, and certain vitamins (Abdul-Rahaman et al., 2019). Moreover, cholesterol is also involved in the biosynthetic process of progesterone, a hormone produced by the corpus luteum and placenta that maintains pregnancy (Abdul-Rahaman et al., 2019).

Numerous stressful situations have been shown to affect blood biochemical and hematological parameters. These include nutritional factors, age, gender, breed, housing conditions, starvation, environmental factors, transportation, pregnancy, and lactation (Waziri et al., 2010; Rawat et al., 2021). Previous research on biochemical blood parameters found alterations in the activity and metabolism of liver enzymes during lactation and dry periods in ruminants (Stojević et al., 2005; Karapehliyan et al., 2007; Bamerny et al., 2022). In addition, there are studies showing that there are large variations in biochemical and hematological parameters among different goat breeds (Iriadam, 2007; Njidda et al., 2013; Al-Bulushi et al., 2017; Saribay et al., 2020; Bamerny et al., 2022).

Pregnancy and lactation are two important physiological states that affect metabolic processes in mammals (Iriadam, 2007). Nutritional requirements are known to increase in both, particularly during the late stages of pregnancy and the early postpartum period (Goff and Horst, 1997). In addition, eighty percent of the fetal development is completed in the late stages of pregnancy, resulting in a major increase in nutritional requirements. Although voluntary feed intake is

reduced there is a high protein demand for mammary development and colostrum production (Bell, 1995). Minerals play a crucial role in animal nutrition. They have a significant role in regulating the physiological functions associated with the postpartum period. It can be hypothesized that the physiological stage may alter the animal's requirements for these components. As a result, in response to these crucial events, alterations in the metabolic profile of animals may occur, influencing the concentration of biochemical parameters in small ruminants (Ahmed et al., 2000; Sobiech et al., 2008; Allaoua and Mahdi, 2018).

The metabolic profile analysis (MPA) is a quantitative test that is commonly employed to facilitate the early diagnosis of several metabolic disorders and to monitor the health status of animals within a flock (Akkaya et al., 2020). To evaluate MPA, various blood parameters, including liver enzymes (Aspartate aminotransferase (AST), Gamma-glutamyl transferase (GGT)), proteins (Total protein, albumin, globulin, and ratios), glucose, cholesterol, blood urea nitrogen (BUN), and minerals (calcium (Ca), magnesium (Mg), and inorganic phosphorus (P)) can be measured in goats (Akkaya et al., 2020).

The objective of this study was to evaluate the changes in MPA in Damascus goats during the pre-pregnancy, early, mid and late pregnancy and post-partum periods.

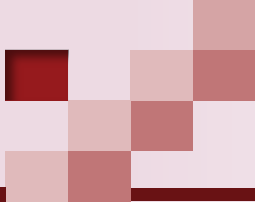
Material and Methods

Animals

The study was performed on twelve Damascus goats aged 3-6 years with an average weight of 40-60 kg, selected from a herd of multiparous goats in which pregnancy was achieved by estrus synchronisation. The animals were grazed on pasture for 12-14 hours, and no supplementary feeding was administered to the animals. Clean and fresh water was provided to the animals daily.

Estrus synchronization and pregnancy diagnosis

Estrus of goats were synchronized during the breeding season (August) with the intravaginal sponge application containing 60 mg medroxyprogesterone acetate (Esponjavet, Hipra, Spain) for nine days and intramuscular injection of 0.075 mg d-cloprostenol (Senkrocin[®], Vetas, Turkey) and 400 IU PMSG (PMSG-Intervet[®], Turkey) on the day of sponge removal. Goats in standing heat were mated naturally with fertile male goats. Pregnancy diagnosis performed twice by transrectal ultrasonographic examination on the 35th day and transabdominal ultrasonographic examination on the 55th day post-mating. This was performed using a 6-8 MHz probe



ultrasound device (Falco 100, Pie Medical, Netherlands). The hairless region above the mammary gland located ventral to the right fossa paralumbal was chosen for ultrasound imaging (Dinç et al., 1994). Pregnancy results were considered positive when a fluid-filled uterus, placentoma, moving fetus and heartbeat were observed together.

Metabolic profile analysis

Following the pregnancy examinations, a total of 12 goats bearing single fetuses were included in the study. Blood samples were collected by jugular venipuncture into tubes containing no anticoagulant from goats before synchronization (BS), during pregnancy [55th (early pregnancy; EP), 95th (mid pregnancy; MP), and 135th (late pregnancy; LP) days], and after parturition (PP). Blood samples were centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and sera were separated. The separated sera were transferred to Eppendorf tubes and stored in a deep freezer at -20 °C until analysis. AST (SGOT) U/L, GGT U/L, BUN mg/dL, Glucose mg/dL, Cholesterol mg/dL, Total Protein g/dL, Albumin/dL, Globulin g/dL, Albumin to Globulin ratio, Calcium g/dL, Magnesium g/dL and Phosphorus g/dL concentrations were measured from serum samples of BS, EP, MP, LP and PP days. All measurements were performed via the automated blood chemistry analyzer (BT 3000 Plus, Biotecnica Instruments, Italy).

Statistical Analysis

For categorical variables, descriptive statistics were presented

as frequencies and percentages, and for continuous variables, as arithmetic means and standard errors. The normality assumption was tested using the Shapiro-Wilk test. Repeated measures ANOVA test was used to determine the effect of the gestation period time on selected metabolic profile parameters in goats. In the analysis of variance for repeated measures, the univariate (classical analysis of variance-uncorrected results) or multivariate approach (multivariate approach-corrected results), the distribution characteristics of the data, Mauchly's Test of Sphericity result and epsilon value were taken into consideration (Singh et al., 2013). Analysis of variance with Bonferroni correction was used for within-group statistical analysis. P values of less than 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed in Statistical Package Program for Social Science (SPSS, version 26.0) software program for Windows (IBM Corp, Armonk, NY, USA).

Results

The results of the study showed that cholesterol, phosphorus, albumin and AST were the parameters most significantly altered in the mid-pregnancy period. Blood urea nitrogen, glucose, calcium and magnesium were the parameters more significantly altered in the post-partum period. The alterations in selected blood serum parameters and minerals during gestation period were given in Table 1 and illustrated by Figures 1-5.

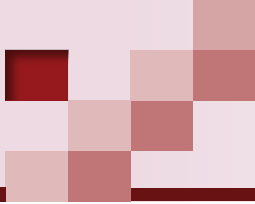
Table 1. Seasonal changes in metabolic profile parameters in goats (mean±SEM).

Parameters		BS	EP	MP	LP	PP	P*
AST(SGOT)	U.L ⁻¹	57.417±2.472 ^e	70.250±2.829 ^c	83.500±2.707 ^{ab}	75.333±3.594 ^{bc}	69.583±3.692 ^{dc}	0.000
GGT	U.L ⁻¹	73.000±2.576 ^{abc}	61.583±3.406 ^e	63.833±2.573 ^{de}	65.667±2.447 ^{cde}	70.083±3.401 ^{bd}	0.023
BUN	mg.dL ⁻¹	6.725±0.496 ^{de}	9.850±0.732 ^c	15.258±0.645 ^b	4.783±0.367 ^e	18.792±1.057 ^a	0.000
Glucose	mg.dL ⁻¹	41.167±2.486 ^{bc}	36.250±1.523 ^{cd}	47.417±0.973 ^{ab}	33.750±2.219 ^{ce}	53.083±2.083 ^a	0.000
Cholesterol	mg.dL ⁻¹	33.917±1.564 ^{bce}	34.500±1.877 ^{de}	43.333±2.571 ^a	41.500±1.654 ^{abd}	38.583±2.999 ^{acd}	0.013
Total Protein	g.dL ⁻¹	7.333±0.166 ^{ac}	7.750±0.188 ^a	7.442±0.118 ^{ab}	6.475±0.146 ^{de}	6.625±0.205 ^{bcd}	0.000
Albumin	g.dL ⁻¹	3.817±0.067 ^{ce}	4.117±0.099 ^{abc}	4.083±0.058 ^b	3.517±0.081 ^d	3.408±0.125 ^{de}	0.000
Globulin	g.dL ⁻¹	3.517±0.143 ^{ab}	3.633±0.125 ^a	3.358±0.087 ^{ace}	2.958±0.096 ^{be}	3.217±0.144 ^{ade}	0.000
Alb/Glob		1.109±0.058	1.143±0.036	1.224±0.032	1.198±0.037	1.080±0.058	0.156
Calcium	mg.dL ⁻¹	10.267±0.167 ^{cd}	10.900±0.278 ^a	10.250±0.228 ^{ad}	10.825±0.176 ^{ab}	8.892±0.648 ^{cde}	0.018
Magnesium	mg.dL ⁻¹	2.308±0.042 ^d	2.717±0.085 ^c	3.067±0.058 ^b	3.442±0.097 ^a	2.167±0.113 ^{de}	0.000
Phosphorus	mg.dL ⁻¹	4.525±0.321 ^a	4.358±0.284 ^{ab}	2.708±0.294 ^e	3.975±0.243 ^{ac}	3.533±0.359 ^{ad}	0.000
Ca/Phos		2.429±0.221b ^{ce}	2.605±0.157 ^{cde}	4.250±0.417 ^a	2.833±0.171 ^{abd}	2.673±0.185 ^{ac}	0.000

BS: before synchronization, EP: early pregnancy (55th day), MP: mid pregnancy (95th day), LP: late pregnancy (135th day), PP: After parturition.

a,b,c,d,e: defines the difference between the columns at the P<0.05 level.

*Repeated measurement ANOVA was used.



Discussion

Many analytes are known to undergo significant pre- and postpartum physiological changes. These changes are physiological variations and do not always indicate disease (Tharwat et al., 2015). For example, enzymatic elevations related to the liver may be observed during lipid metabolism, which occurs in the liver to provide energy (Tharwat et al., 2012; Tharwat et al., 2015). Saribay et al (2020) reported that AST levels in Damascus goats before synchronization and those carrying single fetus were determined to be 76.9 ± 2.7 and 75.5 ± 3.1 U/L, respectively. In this study, AST levels in other periods (early, mid-, and late pregnancy and postpartum), except during the synchronization period were found to be similar to the results of Saribay et al. (2020), and were to be higher in these periods, consistent with the study of Bamerny et al. (2022). Similar to Madan et al., (2020), the highest level of AST was determined in the mid-pregnancy period (Table 1 and Figure 1). The activity of this enzyme (AST) may increase as a result of the essential requirement for amino acids in milk production during the late period of pregnancy or due to changes in liver metabolism during the specified periods (Bamerny et al., 2022). In addition, increased fetal needs during the period may have also influenced this result.

Gamma-glutamyl transferase (GGT) is a membrane-associated enzyme present in cells characterized by elevated secretion or absorption rates. It is evident that elevated activity is observed in the majority of parenchymatous organs, including the liver, spleen, kidneys, pancreas, and intestine (Djuricic et al., 2011).

The regulation of amino acid transport into cells via the Gama-glutamine cycle is one of the recognized activities of GGT (Leibova et al., 2016). Although GGT activity can be observed in several tissues, it is primarily utilized as a serum marker for the diagnosis of liver disease in animals. Some authors posit that the enzyme is linked to the metabolism of glutathione, which plays a significant role in the overall antioxidative state of the body (Kramer and Hoffmann, 1997; Milinković-Tur et al., 2005). It is uncertain how serum GGT and cellular GGT relate to one another, however cellular GGT has been shown to be crucial for antioxidant defense mechanisms (Lim et al., 2004). Besides, it is informed that doe colostrum contains a substantial quantity of GGT. The neonatal intestinal wall permits the passage of colostrum GGT and colostrum antibodies into the plasma (Kramer and Hoffmann, 1997). Tharwat et al., (2015) report an increase in GGT activity following parturition in pregnant goats. In this study, a notable decrease in blood serum GGT levels after synchronization was observed, followed by a gradual increase throughout the gestation and postpartum periods. However, the elevation observed in GGT levels during gestation was not found to be significant. Conversely, the GGT levels detected in the early pregnancy period were significantly lower than those measured both before synchronization and in the postpartum period (Table 1 and Figure 1). The decrease in GGT levels in early pregnancy may be related to the depletion of body reserves as an antioxidant response to pregnancy at a cellular level, while the high levels in the postpartum period may be related to increased production of colostrum for passive transfer to the kid.

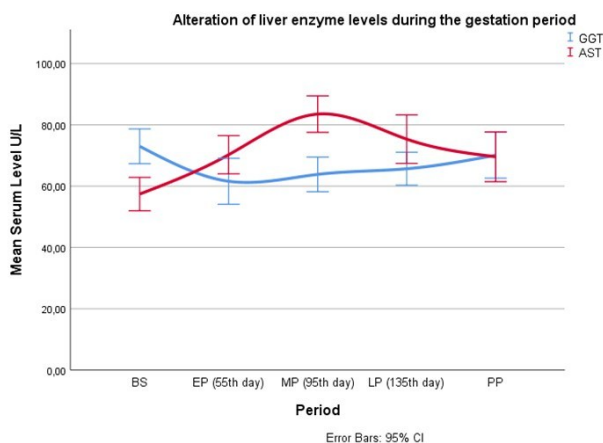


Figure 1. Alteration in liver enzymes level

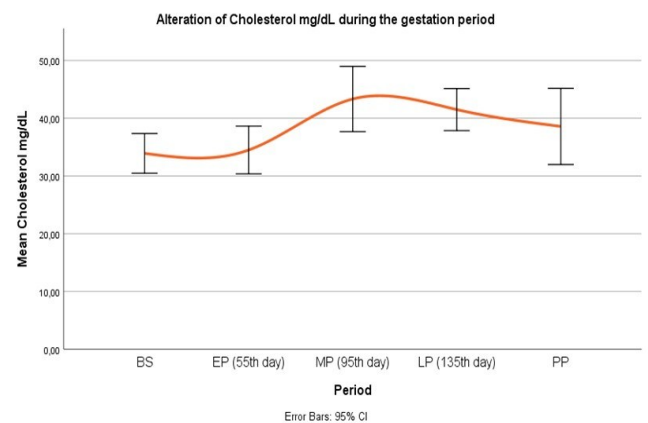
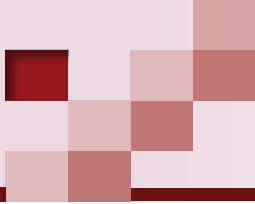


Figure 2. Alteration of cholesterol level



Urea, free fatty acids, triglycerides, and serum total protein are all blood biochemical indicators that reflect an animal's nutritional and health state (Gupta et al., 2007; Bamerny et al., 2022). Alterations observed in urea concentration during pregnancy in goats are associated with protein catabolism and amino acid deamination to meet energy requirements (Madan et al., 2020). The reduction in feed intake resulting from stress and hormonal alterations during the kidding period may lead to a decline in blood urea concentrations in goats around the time of parturition (Madan et al., 2020). In addition, the authors noted a potential reduction in glomerular filtration and urea clearance during the late stages of pregnancy (Rodriguez et al., 1996). Nevertheless, it has been reported that a notable elevation in blood urea nitrogen levels has been documented in various goat breeds during the postpartum period (Sadjadian et al., 2013; Madan et al., 2020). Belkacem et al. (2024) reported that the period when blood urea levels are highest during pregnancy in Damascus goats is the mid-gestation period. Idamokoro et al. (2019) revealed that there may be higher blood urea levels in the postpartum period compared to the late pregnancy period. On the other hand, a study reported that urea levels are lower in pregnant goats than in non-pregnant goats (Abdul-Rahaman et al., 2019). In this study, different levels of blood urea nitrogen were determined in all pregnancy periods, with the highest level being detected in the mid-gestation period (Table 1). Furthermore, the lowest level was determined in late pregnancy, and the highest level was also determined in the postpartum period (Figure 4). Hereby, the study's results appear to be consistent with those of previous studies. The occurrence of periodic differences in urea levels during pregnancy may be associated with protein catabolism and amino acid deamination, which serve to meet the energy

requirements at varying levels throughout the gestational period. Furthermore, the lowest level in late pregnancy may be attributed to a reduction in feed intake resulting from stress and hormonal changes that occur close to parturition.

The developing fetus, uterus, and placenta need the energy provided by direct glucose or glucose derived by hepatic glycogenolysis and gluconeogenesis from glucose precursors (Madan et al., 2020). It has been reported that the fetus demands more glucose, and there is an advantageous connection between the fetal abdomen circumference and maternal blood glucose levels (Parretti et al., 2001; Madan et al., 2020). The glucose level in Damascus goats in carrying a single fetus was detected to be 64.1 ± 2.8 mg.dL⁻¹ by Saribay et al., (2020). Madan et al. (2020) report that the glucose level in single-fetus-carrying Beetal goats was detected to be lower in mid-pregnancy (47.03 ± 4.46 mg.dL⁻¹) than postpartum (57.44 ± 2.45 mg.dL⁻¹). Additionally, Bamerny et al., (2022) stated that the level of glucose in pregnant goats was highest during the mid-pregnancy period. In this study, the postpartum glucose level was significantly higher than that of the late pregnancy period. Conversely, in the mid-pregnancy period, contrary to other gestation periods, glucose level was observed to be higher in goats in this study (Figure 3). The cholesterol levels of goats exhibit variability based on several factors, including age, gender, nutritional intake, gestational and lactation periods, and the transition phase between these stages (Lashari et al., 2021; Tekeli et al., 2024). Modifications in lipid metabolism have been identified in the gestation periods to meet maternal metabolic needs, notably energy requirements since glucose is used for fetal growth (Pusukuru et al., 2016; Madan et al., 2020). In a study (Abdul-Rahaman et al., 2019), cholesterol level was found higher in pregnant goats than non-pregnant goats. In another study, the cholesterol

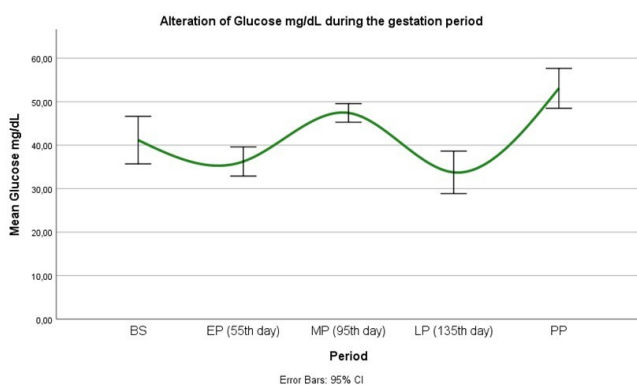


Figure 3. Alteration of glucose level

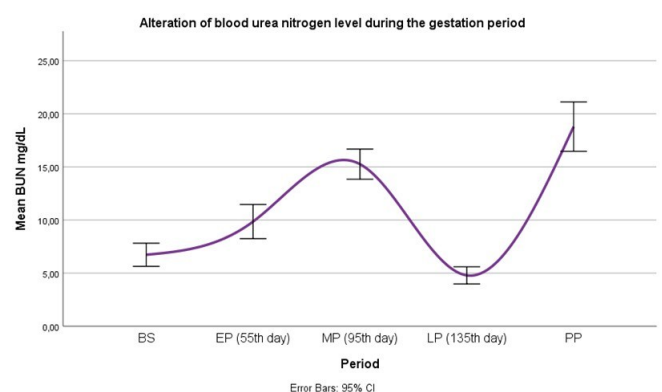
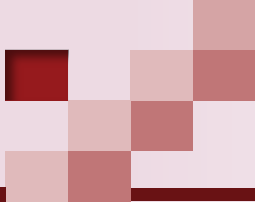


Figure 4. Alteration of blood urea nitrogen (BUN) level



level in single-fetus-carrying Beetal goats was determined to be 50.07 ± 3.15 mg.dL⁻¹ in mid-pregnancy period, and to be 39.82 ± 1.88 mg.dL⁻¹ in postpartum (Madan et al., 2020). Bamerny et al. (2022) reported that cholesterol levels in pregnant goats were the highest during the mid-pregnancy period, paralleling glucose. In contrast, Shittu et al., (2023) noted that the highest cholesterol levels in goats during the gestation period were observed in the mid-pregnancy period, but this was not the case for glucose levels. In this study, the highest cholesterol level in Damascus goats was observed during the mid-pregnancy period, and no notable alterations in cholesterol levels were observed between mid-pregnancy and postpartum (Table 1). These parallel changes observed in both glucose and cholesterol levels, especially in mid-gestation, may be related to meeting the mother's needs as well as providing the energy metabolism required for the development of the fetus. Furthermore, the notable decline in glucose levels documented in the latter stages of pregnancy in this study can be attributed to the fact that eighty percent of fetal development occurs during this period (Bell, 1995).

The accelerated growth of the fetus results in the synthesis of proteins from amino acids obtained from the mother, thereby reducing the concentration of total protein in the dam's bloodstream. This phenomenon contributes to the decline in total protein concentrations observed during late pregnancy in small ruminants (Jainudee and Hafez, 1994; Balıkcı et al., 2007; Idamokoro et al., 2019). Additionally, it is reported that the decrease in albumin in humans may be observed during pregnancy due to either decreased production or increased elimination in urine in pregnancy (Ogbodo et al., 2012; Akkaya et al., 2020). In their 2015 study, Tharwat and colleagues

observed an increase in total protein and globulin levels in goats following parturition, but no change in albumin levels. Similar findings for serum proteins in goats during the transition period are also reported by Soares et al., (2018). The findings of our study indicate that, in the postpartum period, contrary to the late pregnancy period, there was a numerical increase in total protein and globulin levels, but not in albumin levels. However, these changes in the blood proteins did not reach statistical significance. On the other hand, it has been observed that the concentration of blood proteins in pregnancy decreases significantly during the last period of pregnancy (Table 1 and Figure 5). The observed increase in total protein levels in the postpartum period may be attributed to the elevated production of globulins resulting from the increased colostrum production during the final trimester of pregnancy. Conversely, the observed decline in protein levels during the late pregnancy period may be associated with the accelerated fetal development and the increased energy demands of the mother.

In addition to releasing hormones like insulin and acting as a cofactor for enzymes like those in the coagulation cascade, calcium also acts as an intracellular messenger for nerve impulse transmission, muscle contraction, blood vessel constriction and relaxation, among other functions. There is a greater need for calcium during pregnancy and lactation. Following delivery, the need for calcium increases quickly, which is linked to the excretion of significant amounts of this element through milk (Hisira et al., 2013). Processes that require energy expenditure, such as muscle contraction, blood clotting, and heart control, directly involve Ca, in addition to P and Mg, which play an important role in ATP production

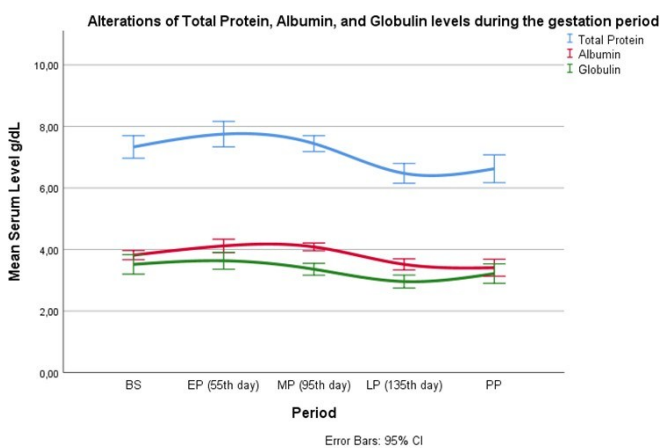


Figure 5. Alteration in serum proteins level

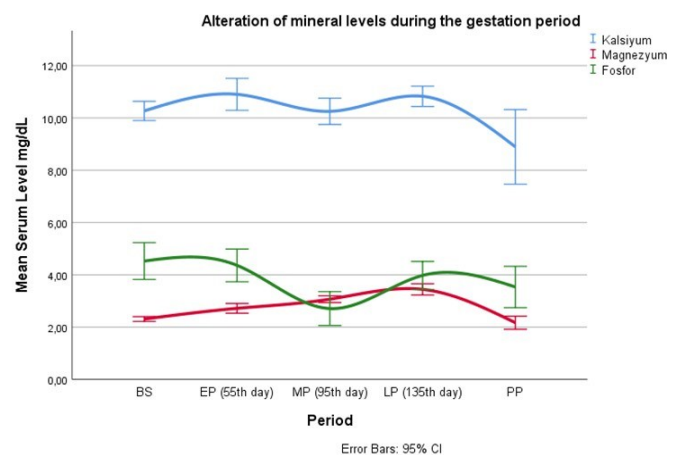
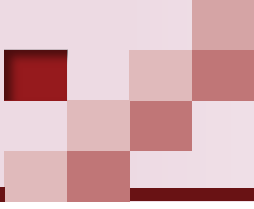


Figure 6. Alteration in minerals level

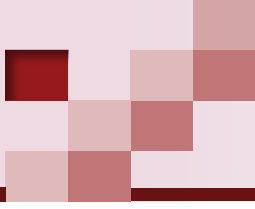


(Suttle, 2010). The physiological changes that occur throughout pregnancy are addressed by the sufficient calcium and magnesium reserves in the bodies of goats until the 80th day of pregnancy. These reserves are sufficient to meet the future development requirements unique to pregnancy (Härter et al., 2015). In order to accommodate the growing fetus and placenta, the uterus undergoes a rapid expansion during the early stages of pregnancy, driven by the proliferation of blood cells, including hemoglobin and platelets (Scheaffer et al., 2001). To meet the increased demand for these minerals, the absorption of Ca and Mg taken from food increases. Additionally, bone mobilization increases and provides additional resources. Härter et al., (2015) reported a slight increase in serum Ca levels until the 80th day of pregnancy. In their 2020 study, Saribay and colleagues also demonstrated that the seasons (breeding or non-breeding) and fecundity influence calcium levels in Damascus goats. In this study, serum Ca levels increased in early pregnancy compared to levels measured before synchronization, while the difference in Ca levels throughout pregnancy did not change statistically significantly. This result is compatible with the stable serum Ca levels expected in women throughout pregnancy (Kovacs, 2001). There are many studies reporting that blood Ca levels decrease in late pregnancy (Elias & Shainkin-Kestenbaum, 1990; Azab & Abdel-Maksoud, 1999; Jacob et al., 2002). However, Lincoln and Lane (1990) indicated that serum Ca concentration remains stable during pregnancy and decreases a few days after parturition. Similarly, Soares et al. (2018) reported that the calcium levels during parturition were lower than those observed in the late pregnancy period. In this study, serum Ca levels, which remained stable throughout pregnancy, including late pregnancy, were observed to decrease rapidly in the postpartum period.

Mg is required for bone development, numerous biological activities, and the regulation of enzyme function. The body requires magnesium, which is known to increase during pregnancy and lactation (Hisira et al., 2013). Thus, during the period of intensive lactation, lactating females are at risk of developing hypomagnesaemia as a result of the significant quantity of magnesium that is absorbed from dietary sources and excreted in the urine (Hisira et al., 2013). According to Yokus and Cakir (2006), cows' magnesium levels decline during pregnancy and gradually increase throughout lactation. In contrast, several studies have found that Mg levels in cows

peaked at 8 months of pregnancy and then declined throughout lactation (Jacob et al., 2002; Yildiz et al., 2006). There are also studies that show that periods do not impact Mg levels in cows (Kulcu and Yur, 2003) or sheep (Dakka and Abd El-Al, 1992). As reported by Vihan and Rai (1987), prepartum periods had the lowest Mg level, followed by parturition in sheep; however, there was no significant difference between prepartum, parturition and postpartum periods in goats. Conversely, Azab and Abdel-Maksoud (1999) discovered that in Baladi goats, plasma Mg levels considerably increased at 4 and 3 weeks before parturition and declined at 2 and 1 weeks prior. The findings of our study indicate that serum magnesium levels exhibit a regular increase throughout the course of pregnancy, followed by a decline to levels observed before synchronization in the postpartum period (Table 1 and Figure 6). The goats utilized in the study were lactating at the time of synchronization and dried off in the final trimester of pregnancy. The highest serum magnesium levels observed during the LP may be explained by the body's retention of magnesium, which is required for milk production. Furthermore, this gradual increase observed during pregnancy may be associated with the regulatory role of magnesium in enzymatic activities, which is consistent with the increases in enzymatic activities observed in this study.

Animals given P-deficient diets rich in Ca may have lower P absorption due to a decrease in rumen P solubility as well as a decrease in the availability of dietary P farther down the small intestine. Milk's P content remains generally stable regardless of dietary P consumption, making it a primary source of endogenous P loss (Qureshi and Deeba, 2019). If dietary P levels are appropriate, the level of dietary calcium (Ca) has no influence on P absorption. The ideal Ca to P ratio has traditionally been established as being between 1:1 and 2:1 due to the Ca to P ratio of bones (Qureshi and Deeba, 2019). In small ruminants, a decline in bone mineralization occurs during the early stages of lactation, followed by an increase in mineral content after mid-lactation (Kovacs, 2014; Qureshi and Deeba, 2019). During pregnancy in mammals, plasma calcitriol levels rise regardless of dietary Ca shortage or PTH levels. Calcitonin levels rise owing to its synthesis in the mammary gland, placenta, and thyroid gland. The developing mammary gland and placenta create PTHrP, which stimulates bone mineralization in the fetus (Kovacs, 2014; Qureshi and Deeba, 2019). Prolactin and placental lactogen directly contribute to increased intestinal calcium absorption when calcitriol is not



present. All of these elements promote bone resorption and stimulate bone metabolism, particularly in the third trimester when the growing fetus has the highest mineral deposition (Qureshi and Deeba, 2019). According to several studies, P levels in goats at various periods of growth, reproduction, pregnancy, and lactation did not significantly differ from one another (Kaushik and Bugalia, 1999; Krajnicakova et al., 2003). However, some studies have also indicated that the levels of phosphorus (P) in goats exhibit a marked increase during the latter stages of pregnancy and the postpartum period (Ahmed et al., 2000; Tanritanir et al., 2009). Pregnant sheep have been shown to have a significant decrease in plasma P levels (Sansom et al., 1982). Gürgöze et al., (2009) reported that serum P levels in sheep were found to be low enough to be below the reference range on day 120 of pregnancy. In the present study, in accordance with Gürgöze et al., (2009), serum P levels were found to be considerably low on day 95 of pregnancy (MP). This significant decrease in serum P levels may be a result of lactation and dry-off as seen in Mg levels. Furthermore, the observed alterations in calcium and phosphorus levels may also be linked to the compensatory mechanism of metabolism that serves to maintain the Ca/P ratio (Table 1) in bone mineral balance during pregnancy. However, since the midterm period of pregnancy also represents the transition from autumn pasture to winter pasture, it may also be possible that all minerals are affected by the feed consumed.

The study results indicated that cholesterol, phosphorus, albumin, and AST were the parameters most significantly altered during the mid-pregnancy period, while blood urea nitrogen, glucose, calcium, and magnesium exhibited the greatest alterations during the postpartum period. In light of the results of the study, it was concluded that performing metabolic profile analysis in pregnant Damascus goats from the mid-pregnancy period to the postpartum period may be beneficial in preventing potential metabolic complications. Furthermore, it should be considered that the amounts of the metabolites indicated may exhibit dramatic fluctuations that could be fatal, particularly in multiple pregnancies. So, to control the serum levels of metabolites that may change according to the pregnancy period in herds, veterinary practitioners can also apply different strategies thanks to metabolic profile analyses, ranging from nutritional changes to feed additives.

Ethical approval: The presented study was conducted with

the decision numbered 2024/10-03 of Hatay Mustafa Kemal University, Animal Experiments Local Ethics Committee.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

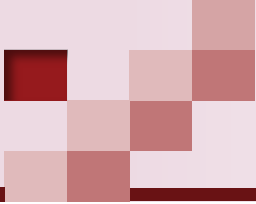
Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to report.

Acknowledgement: None

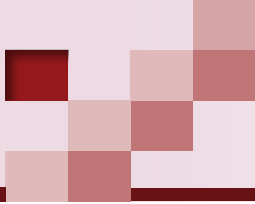
Authors' Contributions: SİK, EKÜ, AMK contributed to the project idea, design and execution of the study. EKÜ and AMK contributed to the acquisition of data. SİK analyzed the data. SİK drafted and wrote the manuscript. EKÜ and AMK reviewed the manuscript critically. All authors have read and approved the finalized manuscript.

References

1. Abdul-Rahaman, Y. T., Humid, A. O., & Al-Dulaimi, H. S. H. (2019). Effect pregnant and non-pregnant on haematological and biochemical parameters of Qatari goats in Iraq. *Indian Journal of Public Health*, 10(10), 2743-2748.
2. Ahmed, M. M., Siham, A. K., & Barri, M. E. S. (2000). Macromineral profile in the plasma of Nubian goats as affected by the physiological state. *Small Ruminant Research*, 38(3), 249-254. Doi: 10.1016/S0921-4488(00)00166-8
3. Akkaya, F., Senturk, S. E. Z. G. İ. N., Mecitoğlu, Z., Kasap, S., Ertunc, S., & Kandemir, C. (2020). Evaluation of metabolic profiles of Saanen goats in the transition period. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 71(2), 2127-2134. Doi: 10.12681/jhvms.23637
4. Al-Bulushi, S., Shawaf, T., & Al-Hasani, A. (2017). Some hematological and biochemical parameters of different goat breeds in Sultanate of Oman "A preliminary study". *Veterinary world*, 10(4), 461. Doi: 10.14202/vetworld.2017.461-466
5. Allaoua, S. A., & Mahdi, D. (2018). Minero-Biochemical Profiles of Arbia Goats Reared Traditionally Under the Semi-Arid Environment of North-Eastern Algeria During Peri-Parturient Period. *World Journal of Environmental Biosciences*, 7(2-2018), 95-101.
6. Azab, M.E., Abdel-Maksoud, H. A. (1999). Changes in some hematological and biochemical parameters during prepartum and postpartum periods in female Baladi goats, *Small Ruminant Research*, 34 (1), 77-85. Doi: 10.1016/S0921-4488(99)00049-8
7. Balıkcı, E., Yıldız, A., & Gürdoğan, F. (2007). Blood metabolite concentrations during pregnancy and postpartum in Akkaraman ewes. *Small Ruminant Research*, 67(2-3), 247-251. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2005.10.011
8. Bamerny, A. O., Barwary, M. S., & Alkass, J. E. (2022). Changes in some haematological and biochemical parameters in local black goats during pregnancy. *Iraqi Journal of Agricultural Sciences*, 53(2), 378-384.
9. Belkacem, L., Rouabah, Z., Allaoui, A., & Bachtarzi, K. (2024) Breed and Reproductive Status Effects on Some Blood Parameters Dryland Goats (Algeria). *Agricultural Science Digest*. (Online First). Doi: 10.18805/ag.DF-617



10. Bell, A. W. (1995). Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. *Journal of animal science*, 73(9), 2804-2819. Doi: 10.2527/1995.7392804x
11. Dakka, A. A., & Abd El-Al, Th. S. (1992). Studies on mineral picture in the blood sera of Egyptian sheep. *Assiut Veterinary Medical Journal*, 28(55), 242-249. Doi: 10.21608/avmj.1992.186658
12. Dinç, D. A., Taşal, İ., Erdem, H., Semacan, A., & Aral, S. (1994). Koyunlarda transabdominal ultrasonografi ile yavru sayımı. *Eurasian Journal of Veterinary Sciences* 10, 81-83.
13. Djuricic, D., Dobranic, T., Grizelj, J., Gracner, D., Harapin, I., Stanin, D., ... & Samardzija, M. (2011). Concentrations of total proteins and albumins, and AST, AP, CK and GGT activities in the blood serum Boer and Saanen goats during puerperium. *Reproduction in domestic animals*, 46(4), 674-677. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01726.x
14. Elias, E., & Shainkin-Kestenbaum, R. (1990). Hypocalcemia and serum levels of inorganic phosphorus magnesium parathyroid and calcitonin hormones in the last month of pregnancy in Awassi fat-tail ewes. *Reproduction nutrition development*, 35, 693-699.
15. Goff, J. P., & Horst, R. L. (1997). Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of dairy science*, 80(7), 1260-1268. Doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76055-7
16. Gupta, A. R., Patra, R. C., Saini, M., & Swarup, D. (2007). Haematology and serum biochemistry of chital (*Axis axis*) and barking deer (*Muntiacus muntjak*) reared in semi-captivity. *Veterinary research communications*, 31, 801-808. Doi: 10.1007/s11259-006-0095-8
17. Gürgöze, S. Y., Zortunlu, A. F., Özyurtlu, N., & Icen, H. (2009). Investigation of some biochemical parameters and mineral substance during pregnancy and postpartum period in Awassi ewes. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15(6), 957-963. Doi:10.9775/kvfd.2009.858
18. Härter, C. J., Castagnino, D. S., Rivera, A. R., Lima, L. D., Silva, H. G., Mendonça, A. N., Bonfim, G. F., Liesegang, A., St-Pierre, N., & Teixeira, I. A. (2015). Mineral Metabolism in Singleton and Twin-pregnant Dairy Goats. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28(1), 37-49. Doi: 10.5713/ajas.14.0214
19. Hisira, V., Konvičná, J., Písarčíková, J., Lešková, L., & Mudroň, P. (2013). Dynamics of calcium, phosphorus and magnesium concentrations in goat blood serum during one-year study. XIII Middle European Buiatrics Congress 5-8 June, Belgrade, Serbia. pp 306-313.
20. Idamokoro, E. M., Muchenje, V., Afolayan, A. J., & Masika, P. J. (2019). Variations in some haemato-biochemical markers from a small flock of free ranging Nguni, Boer and Non-descript goats during late gestation and early lactation periods. *Indian Journal of Animal Research*, 53(4), 476-481.
21. İriadam, M. (2007). Variation in certain hematological and biochemical parameters during the peri-partum period in Kilis does. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 54-57. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.11.001
22. Jacob, S. K., Philomina, P. T., & Ramnath, V. (2002). Serum profile of calcium, phosphorus and magnesium in crossbred heifers as influenced by gestation and early lactation. *Indian journal of physiology and pharmacology*, 46(2), 245-248.
23. Jainudee, M. R. and Hafez, E. S. E. (1994). Gestation, prenatal physiology and parturition. In: Hafez, E.S.E (Ed.), *Reproduction in farm animals*. Lea and Febiger, Philadelphia, pp. 247-283.
24. Karapehlivan, M., Atakisi, E., Atakisi, O., Yucayurt, R., & Pancarci, S. M. (2007). Blood biochemical parameters during the lactation and dry period in Tuj ewes. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 267-271. Doi: 10.1016/j.smallrumres.2006.12.006
25. Kaushik, H. K., & Bugalia, N. S. (1999). Plasma total protein, cholesterol, minerals and transaminases during pregnancy in goats. *Indian Veterinary Journal*, 76, 603-606.
26. Kovacs, C. S. (2014). The role of PTHrP in regulating mineral metabolism during pregnancy, lactation, and fetal/neonatal development. *clinical reviews in bone and mineral metabolism*, 12, 142-164. Doi: 10.1007/s12018-014-9157-6
27. Kovacs, C.S. (2001). Calcium and bone metabolism in pregnancy and lactation. *Endocrine Reviews*. 86, 344-2348. Doi: 10.1210/jcem.86.6.7575.
28. Krajnicakova, M., Kovac, G., Kostecky, M., Valocky, I., Maracek, I., Sutiakova, I., & Lenhardt, L. (2003). Selected clinic-biochemical parameters in the puerperal period of goats. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 47, 177-182.
29. Kramer, J. W., & Hoffmann, W. E. (1997). Clinical enzymology. In *Clinical biochemistry of domestic animals* (pp. 303-325). Academic press. Doi: 10.1016/B978-012396305-5/50013-0
30. Kulcu, R., & Yur, F. (2003). A study of some serum mineral levels before and during pregnancy and during lactation period of sheep and cattle. *Biological Trace Element Research*, 92, 275-280. Doi: 10.1385/BTER:92:3:275
31. Lashari, M. H., Ahmad, I., Masood, S., Farooq, U., Anam, M., Akhtar, M. S., ... & Nawaz, M. (2021). Hematological and biochemical parameters of pregnant and lactating goats in rangeland of Cholistan desert, Bahawalpur, Pakistan. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(1), 2781-2786. Doi: 10.12681/jhvms.26765
32. Leibova, V. B., Shapiev, I. S., & Lebedeva, I. Y. (2016). Blood enzymatic activity in Saanen goats during different periods of the reproductive cycle and their association with the completion of pregnancy. *Agricultural Biology*, 51(2), 238-246. Doi: 10.15389/agrobiol.2016.2.238
33. Lim, J. S., Yang, J. H., Chun, B. Y., Kam, S., Jacobs Jr, D. R., & Lee, D. H. (2004). Is serum γ -glutamyltransferase inversely associated with serum antioxidants as a marker of oxidative stress?. *Free Radical Biology and Medicine*, 37(7), 1018-1023. Doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.032
34. Lincoln, D. S., & Lane, W. M. (1990). Serum ionized calcium concentration in clinically normal dairy cattle, and changes associated with calcium abnormalities, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197, 1471-1474.
35. Madan, J., Sindhu, S., & Rose, M. K. (2020). Changes in plasma biochemical parameters and hormones during transition period in Beetal goats carrying single and twin fetus. *Veterinary World*, 13(6), 1025. Doi: 10.14202/vetworld.2020.1025-1029
36. Mansour, S., Shakweer, W., Abou Ward, G., Omer, H., & El Naggar, S. (2024). Comparative Study Among Boer, Damascus and Their Crossbred Goats: Performance, Digestion, Nutritive Values and Blood Parameters. *Egyptian Journal of Veterinary Sciences*, 55(5), 1229-1237. doi: 10.21608/ejvs.2024.251060.1683
37. Milinković-Tur, S., Perić, V., Stojević, Z., Zdelar-Tuk, M., & Piršljini, J. (2005).



- Concentrations of total proteins and albumins, and AST, ALT and GGT activities in the blood plasma of mares during pregnancy and early lactation. *Veterinarski arhiv*, 75(3), 195-202.
38. Njidda, A. A., Hassan, I. T., & Olatunji, E. A. (2013). Haematological and biochemical parameters of goats of semi arid environment fed on natural grazing rangeland of northern Nigeria. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 3(2), 01-08.
39. Ogbodo, S. O., Nwagha, U. I., Okaka, A. N. C., Okeke, A. C., Chukwurah, F. E., & Ezeonu, P. O. (2012). Low levels of some nutritional parameters of pregnant women in a rural community of South East Nigeria: Implications for the attainment of the millennium developmental goal. *Annals of medical and health sciences research*, 2(1), 49-55. Doi: 10.4103/2141-9248.96939
40. Parretti, E., Mecacci, F., Papini, M., Cioni, R., Carignani, L., Mignosa, M., La Torre, P., & Mello, G. (2001). Third-trimester maternal glucose levels from diurnal profiles in nondiabetic pregnancies: correlation with sonographic parameters of fetal growth. *Diabetes Care*, 24(8), 1319-1323. Doi: 10.2337/diacare.24.8.1319
41. Pusukuru, R., Shenoi, A. S., Kyada, P. K., Ghodke, B., Mehta, V., Bhuta, K., & Bhatia, A. (2016). Evaluation of lipid profile in second and third trimester of pregnancy. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 10(3), QC12. Doi: 10.7860/JCDR/2016/17598.7436
42. Qureshi, A. S., & Deebea, F. (2019). Phosphorus Dynamics in Ruminants-An Overview. *EC Veterinary Science*, 4(6), 426-438.
43. Rawat, K., Gupta, R. S., Kurechiya, N., Rawat, N. S., & Mahour, S. S. (2021). Variation in hematology and blood biochemical profile during pregnancy in Sirohi goats. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9(1), 2180-2182.
44. Rodriguez, M. N., Tebot, I., Bas, A. L., Nievas, C., Cirio, A., & Leng, L. (1996). Renal functions and urea handling in pregnant and lactating Corriedale ewes. *Canadian Journal of Animal Science*, 76(3), 469-472. Doi: 10.4141/cjas96-070
45. Sadjadian, R., Seifi, H. A., Mohri, M., Naserian, A. A., & Farzaneh, N. (2013). Variations of energy biochemical metabolites in periparturient dairy Saanen goats. *Comparative Clinical Pathology*, 22, 449-456. Doi: 10.1007/s00580-012-1431-8
46. Sansom, B. F., Bunch, K. J., & Dev, S. M. (1982). Changes in plasma calcium, magnesium, phosphorus and pyroxyproline concentrations in ewe from 12 weeks before till 3 weeks after lambing. *British Veterinary Journal*, 138, 393-401
47. Saribay, M. K., Naseer, Z., Doğruer, G., Özsoy, B., & Ateş, C. T. (2020). Variations in serum metabolites in response to season, cyclicality, and pregnancy in estrus-synchronized Damascus goats. *Tropical animal health and production*, 52, 1519-1525. Doi: 10.1007/s11250-019-02131-6
48. Scheaffer, A. N., Caton, J. S., Bauer, M. L., & Reynolds, L. P. (2001). Influence of pregnancy on body weight, ruminal characteristics, and visceral organ mass in beef heifers. *Journal of Animal Science*, 79(9), 2481-2490. Doi: 10.2527/2001.7992481x
49. Shittu, O. O., Okwelum, N., Famakinde, S. A., Odeyemi, A. J., & Toviesi, D. P. (2023). Haematological, serum biochemical and hormonal profile in West African Dwarf goats during pregnancy. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 56(1), 50-57. Doi: 10.2478/ats-2023-0006
50. Singh, V., Rana, R. K., & Singhal, R. (2013). Analysis of repeated measurement data in the clinical trials. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 4(2), 77. Doi: 10.4103/0975-9476.113872
51. Soares, G. S. L., Souto, R. J. C., Cajueiro, J. F. P., Afonso, J. A. B., Rego, R. O., Macêdo, A. T. M., Soares, P. C., & Mendonça, C. L. (2018). Adaptive changes in blood biochemical profile of dairy goats during the period of transition. *Rev. Méd. Vét*, 169, 65-75.
52. Sobiech P, Milewski S, & Zduńczyk S (2008). Yield and composition of milk and blood biochemical components of ewes nursing a single lamb or twins. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52(4), 591-596.
53. Stojević, Z., Piršljini, J., Milinković-Tur, S., Zdelar-Tuk, M., & Beer Ljubić, B. (2005). Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. *Veterinarski arhiv*, 75(1), 67-73.
54. Suttle NF. The mineral nutrition of livestock. 4th ed. CABI International; Wallingford, UK: 2010
55. Tekeli, H., Şensoy, S., & Aşıcı, G. S. E. (2024). Determination of Serum Biochemical Profile and Oxidant-Antioxidant Activities in Damascus Goats at Different Ages. *Veterinary Sciences and Practices*, 19(1), 1-8. Doi: 10.17094/vetsci.1471422
56. Tharwat, M., Ali, A., & Al-Sobayil, F. (2015). Hematological and biochemical profiles in goats during the transition period. *Comparative clinical pathology*, 24, 1-7. Doi: 10.1007/s00580-013-1842-1
57. Tharwat, M., Oikawa, S., & Buczinski, S. (2012). Ultrasonographic prediction of hepatic fat content in dairy cows during the transition period. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 3(1), 1-5. Doi: 10.4172/2157-7579.1000111
58. Vihan V. S., & Rai, P. (1987). Certain haematological and biochemical attributes during pregnancy, parturition and post-partum periods in sheep and goats, *Indian Journal of Animal Science*, 57, 1200-1204.
59. Waziri, M. A., Ribadu, A. Y., & Sivachelvan, N. (2010). Changes in the serum proteins, hematological and some serum biochemical profiles in the gestation period in the Sahel goats. *Vet. arhiv*, 80(2), 215-224.
60. Yildiz, H., Kaygusuzoglu, E., & Yildiz, S. (2006). Investigation of relationship between serum progesterone, vitamin A, β carotene and magnesium levels during pregnancy and at postpartum period *Firat University Journal of Health Sciences*, 20(5): 345-349
61. Yokus, B., & Cakir, D. U. (2006). Seasonal and physiological variations in serum chemistry and mineral concentrations in cattle. *Biological Trace Element Research*, 109, 255-266. Doi: 10.1385/BTER:109:3:255



Derleme makalesi / Review article

Fare sperminin kriyoprezervasyonu

İbrahim GÜVENÇ^{1a*}, Cengiz YILDIZ^{2b}¹ Hatay İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, Hatay, Türkiye² Yalova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi, Yalova, Türkiye

Cryopreservation of mouse sperm

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

02.05.2024

Revizyon/Revised:

25.08.2024

Kabul / Accepted:

17.10.2024

ORCIDS:

^a 0000-0002-9309-7133^b 0000-0002-9166-8836

Abstract:

Mice are preferred in scientific studies due to their small size, easy availability, rapid reproduction, and ability to create new generations in a short time. Since mice and humans have the same structure in terms of protein and DNA similarity, they are frequently used as experimental animals. In the studies conducted, specialized mouse breeds with various characteristics have been produced. These mice are mainly used as disease models in areas such as genetic diseases, cancer, immunology, and vaccine production in humans. The genetic resources of mutant mouse breeds produced by transgenic and mutation methods and many endangered animal species can be preserved by cryopreservation. For this purpose, sperm banks and related consortia are established for many species. Sperm cryopreservation plays a crucial role in safeguarding genetic diversity both now and in the future, ensuring the preservation and enhancement of valuable genetic traits in mice used for research and practical applications. This review aims to provide information about the cryopreservation of mouse spermatozoa.

Keywords: Mice, Spermatozoa, Cryopreservation

Fare sperminin kriyoprezervasyonu

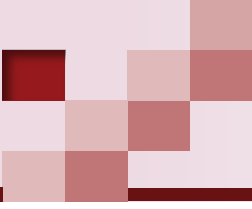
Özet:

Fareler küçük yapıya sahip olmaları, kolay temin edilmeleri, hızlı üreyebilmeleri ve kısa sürede yeni jenerasyon oluşturabilme özelliklerinden dolayı bilimsel çalışmalarda çok fazla tercih edilmektedir. Fareler ile insanlar protein ve DNA benzerliği yönünden aynı yapıya sahip olduklarından deney hayvanı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalarda çeşitli özellikler taşıyan özelleşmiş fare ırkları üretilmiştir. Bu fareler başlıca; insanlarda genetik hastalıklar, kanser, immünoloji, aşı yapımı gibi alanlarda hastalık modeli olarak kullanılmaktadırlar. Transgenik ve mutasyon metotları ile üretilen mutant fare ırklarının ve nesli tükenmekte olan birçok hayvan türünün genetik kaynakları kriyoprezervasyon ile korunabilmektedir. Bu amaçla birçok türler için sperm bankaları ve bununla ilgili konsorsiyumlar oluşturulmaktadır. Araştırma ve uygulamalar için değerli genetik özelliklere sahip farelerin genlerini korumak ve artırmak amacıyla sperm kriyoprezervasyonu günümüzde ve gelecekte önemli bir genetik yapıyı koruma kaynağı olacaktır. Bu derlemede fare sperminin kriyoprezervasyonu hakkında bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar kelimeler: Fare, Spermatozoa, Kriyoprezervasyon

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: i.guenc@hotmail.com

How to cite this article: Güvenç İ ve Yıldız C (2024). Fare sperminin kriyoprezervasyonu. *Antakya Vet. Bil. Derg.*, 3(2), 50-57.



Giriş

Genetik hastalıkların tedavisi ve önlenmesi konusunda transgenik deney hayvanlarının kullanımı araştırmalarda önemli bir rol oynamaktadır. Fareler genetik araştırmalarda sıklıkla tercih edilen model organizmalardır. Birçok memeli türünün spermi 1950' li yıllara kadar başarıyla dondurulsa da fare sperminin başarılı bir şekilde dondurulması ve çözüm sonu canlılık 1990 yılında rapor edilmiştir (Tada ve ark., 1990). Fare sperminin dondurulması konusundaki bu çalışmalar, genetik ve biyomedikal araştırmalar için büyük bir adım olmuştur ve bu yöntemler, modern genetik araştırmaların temel taşlarından biri haline gelmiştir. Son yıllarda birçok hayvan türünün spermi başarılı şekilde dondurulmakta, -196°C' deki sıvı azot içerisinde uzun süreli olarak saklanabilmektedir. Hayvan türlerine göre spermatozoonların başarılı bir şekilde kriyoprezervasyonu farklılıklar göstermesine rağmen son 30-40 yılda önemli derecede standardize edilmiştir (Hammerstedt ve ark., 1990).

Gelişen teknikler ile birlikte dondurma ve çözündürme işlemleri sonrası %50 oranından daha fazla motilite ve fertilitate elde edilmektedir. Ancak güncel kriyoprezervasyon tekniklerinin çoğunun sperm yapısı, fonksiyonu ve fertilitate parametreleri üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Kriyoprezervasyonun akrozom bütünlüğü ve yapısında bozulmaya, hücresel enerji üretiminde rol alan mitokondrilerde bozukluklara, motilitenin düşmesine, DNA hasarına neden olmasından dolayı sperm hücrelerinin hayatta kalma sürelerini azalttığı ve fertilitate parametrelerini düşürdüğü rapor edilmiştir (Wongtawan ve ark, 2006). Dondurma işlemi soğuk stresi nedeniyle hücre membranındaki fosfolipid yapılarını etkilemekte, hücre membran geçirgenliğini ve fonksiyonunu değiştirmektedir (Lessard ve ark, 2000). Kriyoprezervasyonun başarısı, kullanılan sulandırıcıların tipi, kriyoprotektan maddeler arasındaki etkileşim, dondurma ve çözündürme hızı, hayvanlar arası bireysel farklılıklar, sperm depolama şekli gibi birçok unsurlara bağlıdır. Kriyoprezervasyonda sadece dondurma sırasında değil dondurma öncesinde yapılan işlemlerde de spermde kayıplar meydana gelmektedir. Motilite spermatozoonlar fertilitate yeteneği hakkındaki en güçlü in vitro veri olmasına karşın dondurma-çözündürme sonrası tam olarak güvenilir bir fertilitate parametresi değildir (Samper ve ark., 1991). Kriyoprezervasyon işlemi sonrasında fertilitate oranlarını iyileştirmek amacıyla dünya genelinde ve ülkemizde çalışmalar hızla devam etmektedir.

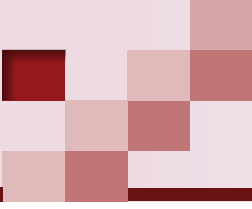
Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar fare sperminin dondurulmasında kullanılan dondurma-çözündürme işlemleri sırasında hücre ve dokularda meydana gelebilecek zararları önlemek için kullanılan kimyasal ajanlardır. Genellikle koruyucu etkilerini buldukları ortamdaki donmamış fraksiyonu artırıp iyon miktarını azaltarak oluştururlar (At ve ark., 1996). Kriyoprotektanlar hücrelerin dondurulması sırasında meydana gelen soğuk şoku, hücre içi kristal oluşumu, çözülme sırasındaki dekriztalizasyon membransal destabilizasyon durumlarına karşı koruyucu etki gösterir (Bucak ve Tekin, 2007).

Kriyoprezervasyon işlemi öncesinde sperm kriyoprotektan maddelerle ekilibrazyona bırakılarak, hücre içi ve hücre dışı dengelenmeleri sağlanır. Bu maddelerin düşük molekül ağırlıkta olmaları ve toksik etkilerini ancak belirli dozlarda göstermeleri en önemli özellikleri arasında gösterilmektedir. Hücrelerin başarılı bir şekilde dondurulması için, suyun ve kriyoprotektan maddelerin plazma membranından basit difüzyon ve hızlı transtport özellikte olması gerekir. Ayrıca membranlarda taşıma işleminde görevli protein yapıda olan su kanalları (aquaporin) tespit edilmiştir. Bu proteinlerin sulandırıcılara katılmasıyla hücrelerin soğuk zararlarına karşı dayanıklılığı artmaktadır (Edashige ve ark., 2006).

Düşük molekül ağırlığına sahip hücre içerisine girebilen (internal) kriyoprotektanlar, dimetilsülfoksit (DMSO), propilen glikol, gliserol, 2,3 bütanediol, etilen glikol (EG), 1,2 propanediol ve diğer bazı alkoller bu sınıfa dahildir (Sağırkaya ve ark., 2001). Bu tarz kriyoprotektanlar hücre içerisine girerek hücre içi buz kristallerinin oluşumunu -40°C'ye kadar aşağı çekerler ve hem hücre içi hem hücre dışı etki gösterebilirler (Pickett ve Amann, 1993). Bu tür kriyoprotektanlar donma sırasında elektrolit yoğunluğunu düşürür, dehidrasyonu düzenleyerek hücresel yapıları korur ve düşük sıcaklıkların oluşturduğu ozmotik büzüşme oranını azaltırlar.

Hücre membranından geçemeyen (eksternal) kriyoprotektanlar, sıvı ve katyonlara karşı membran geçirgenliğinde artış oluşturarak ozmotik strese karşı membranlarda esneklik meydana getirir ve donma-çözünme sırasında oluşan lipit peroksidasyonunu düşürür. Eksternal kriyoprotektanlar, sakkaritler ve makromoleküller olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu kriyoprotektanlar hücre dışı ortamdaki ozmotik basıncı yükselterek suyun spermatozoon içerisinden dışarı doğru çıkmasına neden olur, bu olayın hücre içi buz



kristallerinin oluşumu engelleyerek fiziksel zararları önlediği düşünülmektedir (Steinmann, 1996).

Makromoleküllerden en önemlisi olan BSA (bovine serum albümin)'nin membranlar üzerinde koruyucu etkisi bulunmaktadır. Hücre membranında bulunan kolesterolün akmasını önleyerek ve antioksidan özelliği ile dondurma-çözdürme esnasında açığa çıkan serbest radikalleri elimine ederek etki gösterirler (De Leeuw ve ark., 1993).

Glukoz, rafinoz, sükroz ve trehaloz sakkaritlere örnektir. Sakkaritler hücrelerde dehidrasyon oluşturarak intrasellüler kristalizasyonu, membranlardaki fosfolipit yapılarla bir araya gelerek membran hasarını ve çözünme sırasında oluşabilecek ozmotik şişmeyi önlemektedir (Rudolph ve Crowe, 1985). Dondurma-çözdürme sonrası daha iyi sonuçlar elde etmek amacıyla yumurta sarısı, glisin, sitrat gibi kriyoprotektanlar da solüsyonlara katılmaktadır.

Hem internal hem eksternal kriyoprotektanların spermatozoonlara bazı zararlar verdiği bildirilmiştir. Bu zararlar ozmotik basınç kaynaklı oluşan fiziksel hasarlar veya hücresel yapıların biyokimyasal bozukluklarından oluşur (Wowk ve ark., 2000).

Nakagata ve ark. (2000) çalışmalarında kullanılan %18 rafinoz ve %3 yağsız süt tozu genellikle fare sperminin dondurulmasında kullanılmaktadır.

Kriyoprezervasyon Mekanizması ve Kriyohasar

Kriyoprezervasyon esnasında ekstrasellüler solüsyon/medyum -5°C ila -100°C'de kendiliğinden veya etkime yoluyla kristalleşirken, intrasellüler solüsyon hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Ekstrasellüler kısmın buzlaşması sebebiyle bu ortamda bulunan maddelerin yoğunluğu artmaktadır. Bu durum hücre içi ve dışındaki kimyasal maddelerde yoğunluk farkının oluşmasına sebep olur. Oluşan farklı denge ve yapı sebebiyle hücre içindeki bir miktar sıvının dışarı çıkması ile hücre içerisinde yoğunluk artışı meydana gelir ve sonrasında hücre içerisinde de buz kristalleri oluşmaya başlar. Hücrelerin dondurulması sırasında meydana gelen bu oluşumlar çözdürme esnasında da (ters yönde dekrizalizasyon halinde) meydana gelir (Mazur, 1990).

Kriyohasar

Kriyohasar fare sperminin dondurulması ve saklanmasıyla karşılaşılacak önemli sorunlardan biri olup, bu hasarın en aza indirilmesi için uygun kriyoprotektanların ve dondurma protokollerinin uygulanması önemlidir. Soğutma zararı

(kriyohasar) soğuk şoku, hiperozmotik stres, ozmotik büzüşme-şişme gibi sebepler sonucu meydana gelmektedir. Soğuk şokuna maruz kalan hücrelerde oluşan zararlar, intrasellüler dehidrasyon, membran yapısında bulunan lipit ve proteinlerde denatürasyon, akrozomal enzimlerin salınımı, spermde motilite kaybı ve dairesel hareket, hücre ve endoplazmik retikulumda ozmotik şişme olarak sıralanabilir (Curry ve Watson, 1994; Sing ve ark., 1996; Watson 1995; Watson 2000; Woods ve ark., 2000). Bu zararlı etkiler sonucunda hücrelerde serbest radikal maddelerin oluşumu, ATP sentezinde problemler, apoptozis, polispermi, tetraploidi ve en nihayetinde fertilitate kaybı oluşmaktadır (Shaw ve ark., 2000).

Kristal oluşumu

Fare sperminin kriyoprezervasyonu sırasında oluşan buz kristalleri spermatozoonların canlılığını ve kalitesini olumsuz etkileyebilmektedir. Kristalleşme endotermik süreç olup, sıvılardaki kristalleşme esnasında ortamdaki donamamış fraksiyonun fiziksel özelliği değişmekte, kristalleşme sonucunda açığa çıkan gaz ortam vizkozitesini yükseltmekte ve pH değişikliklerine sebep olmaktadır. Kristalleşmenin oluşturduğu stres, hücrelerde ozmotik büzüşmeye ve membranlardaki lipit yapısında değişikliklere sebep olmaktadır (Watson, 1995; Woods, 2000).

Ozmotik stres ve ozmotik şişme

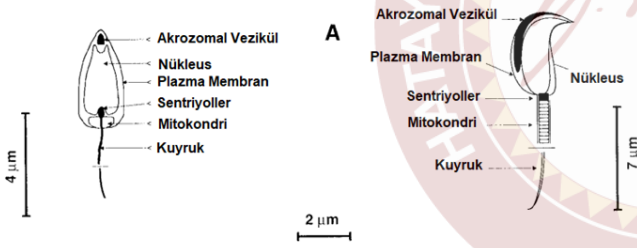
Donma sürecinin başarısını etkileyen en önemli faktör hücrelerde oluşan ozmotik strestir. Ozmotik stres hücre içi ve hücre dışı ortamdaki ozmotik değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Bu farklılığın hesaplanması, hücrelerden uzaklaştırılacak sıvının oranını belirlemede, uzaklaştırılacak su oranı da ortama ilave edilecek kriyoprotektan maddelerin yoğunluğu ile ilişkilidir (Curry ve Watson, 1994). Kriyoprotektan maddeler buldukları ortamı hiperozmotik hale getirmekte, hücre içerisine girdiklerinde hücrelerde dehidrasyona neden olmaktadır. Bu maddeler ortamdaki uzaklaştırıldığında hücreler tekrar şişerek izoozmotik basınca ulaşmaktadır (Woelders, 1997). Ozmotik basınç değişimleri kritik noktaları aştığında, hiperozmosize bağlı olarak dönüşümü olmayan bir membran yıkımı oluşturur. Hücrelerde küçük porların olması, potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışlarını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal ozmotik hemolize daha duyarlı hale getirir. Bu olumsuz durumu önlemek için kriyoprotektanlar ortama kademeli olarak ilave edilmeli ve hücrelerin eksternal kriyoprotektan içeren sıvılarıyla muamele edilmesi gerekmektedir (Gao ve ark., 1993; Kasai, 2002; Pedro ve ark., 1997).



Fare Sperminin Dondurulması

Fare Sperm Morfolojisi

Kemirgenlerde spermatozoonların in vitro özellikleri, spermatozoona ait membran lipid içeriği ve bileşimindeki biyokimyasal farklılıklardan ötürü diğer memeli spermatozoonlarından kısmen farklıdır (Parks ve Lynch, 1992). Kemirgenlerin spermatozoonları morfolojik olarak diğer memelilere kıyasla kanca benzeri bir baş, daha uzun bir orta kısım ve kuyruk yapısına sahiptir (Şekil 1) (Cardullo ve Baltz, 1991). Santrifüj, pH, viskozite, ozmotik stres gibi bir takım çevre değişikliklerine karşı son derece hassastır ve bu nedenle kriyoprezervasyonu diğer memeli spermatozoonlarından daha zor olduğu kanıtlanmıştır (Varisli ve ark., 2009; Nakatsukasa ve ark., 2003; Chulavatnatol, 1982; Si ve ark., 2006).



Şekil 1. Fare Spermatozoon Anatomisi (Darszon ve ark., 2002)

Elektroejekülatör yardımıyla sperm alma yönteminde, erkek farelerin rektumunda bulunan gaita masaj yöntemiyle boşaltıldıktan sonra uygun ebatlardaki prob serum fizyolojik ile kayganlaştırılarak rektuma yerleştirilir. Belli aralıklarla gönderilen elektriksel uyarım ejakülasyonu teşvik eder ve sonrasında sperm 25 µl'lik kapillar pipete alınır. Sperm alındıktan sonra üretranın veziküler bez salgılarıyla kapanmasını engellemek için glans penisteki koagulum forseps yardımıyla temizlenir (Anderson ve ark., 1983; Tecirlioğlu ve ark., 2002).

Fare öldükten sonra kauda epididimisten sperm alınmasında erkek fareler servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülür. Daha sonra abdomen laparoskopisiyle genital organlar dışarı çıkartılır ve yağ dokularından arındırılarak kauda epididimiler ayırılır. Alınan kauda epididimiler uygun bir sperm medyumu içerisine alınarak cerrahi makas yardımıyla en az beş yerinden kesilerek sperm medyum içerisine dağılması sağlanır. Son olarak epididimis parçaları medyum içerisinden uzaklaştırılarak sperm süspansiyonu elde edilmiş olur (Akman, 2007).

Farelerde in vitro deneylerde ejakülat yerine epididimal sperm kullanılmaktadır. Ejaküle edilmiş fare spermının toplanması, epididimal sperm elde etmekten çok daha zor ve pahalıdır (Li ve ark., 2015). Ayrıca, çeşitli memeli türlerinde suni vajen ve elektroejakülasyon yöntemiyle sperm toplanabildiği halde farelerde sperm toplamak için uygun bir suni vajen yoktur ve elektroejakülasyon yöntemiyle elde edilen sperm fertilitite oranları düşüktür (Tecirlioğlu ve ark., 2002; Li ve ark., 2016). Epididimal fare spermi motilite, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oositle fertilizasyon kabiliyetine sahiptir (Chang, 1984). Böylece kauda epididimisten elde edilen fare spermının, olgun sperm ile aynı işlevlere sahip olduğu görülmektedir.

Fare Spermının Dondurulması

Fare spermi, dondurma aşamaları sırasında meydana gelecek hasarlar yönünden diğer evcil hayvanlarının spermine göre daha hassastır (Agca ve ark., 2003) Bu hassas yönleri, dondurma sırasında oluşan serbest oksijen radikallerine, soğuk şokuna, santrifüj, pipetleme, karıştırma gibi mekanik stres faktörlerine karşı duyarlı olmaları, spermatozoon baş kısmının diğer türlerden farklılık göstermesi, zayıf membran yapısına sahip olmalarından dolayı ortamdaki ozmotik basınç değişikliklerini tolere edebilme güçlerinin sınırlı olması olarak sayılabilir (Noiles ve ark., 1997; Songsasen ve Leibo, 1997;

Farelerden Sperm Alınması

Farelerden sperm 3 farklı yöntemle alınmaktadır. Bu yöntemler, dişi genital kanaldan alınması, elektroejakülasyon yöntemiyle alınması ve kauda epididimisten alınması olarak sıralanabilir.

Dişi genital kanaldan sperm alınması yönteminde, erkek ve dişi fareler aynı kafese konulur ve çiftleşmeleri için beklenir, çiftleşme olup olmadığının tespiti amacıyla vaginal tıkaç kontrolü yapılır. Dişide vaginal tıkaç tespit edildikten sonra servikal dislokasyon ile ötenazi yapılır. Ardından laparotomi uygulanarak genital organlar dışarı alınır. Bir tanesi ovaryumlar ile uterus arasına diğeri vaginal tıkaçın hemen kranialine olmak üzere iki ligatür atılır. Ligatürler arasında kalan genital organlar bir makas yardımıyla dışarı alınarak uygun bir solüsyonla yıkanır ve sperm steril bir tüpe alınır (Songsasen ve Leibo, 1998).



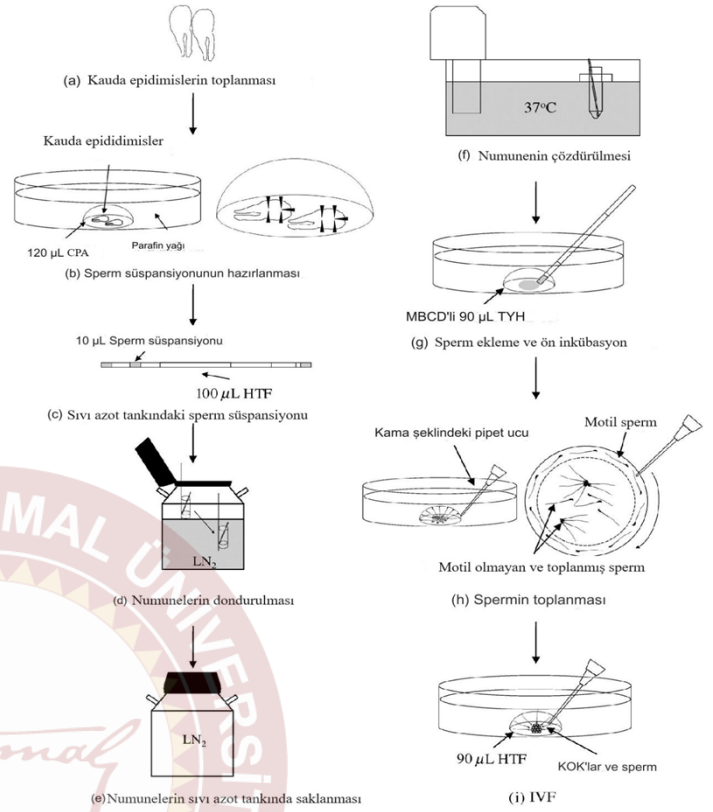
Storey ve ark., 1998; Katkov ve ark., 1998; Dewit ve ark., 2000; Koshimoto ve ark., 2000; Koshimoto ve Mazur., 2002). Fare sperminin çeşitli biyolojik özellikleri nedeniyle kriyoprotektanların dondurma medyumuna eklenmesi (CPA), sperm membranının ozmotik basınç değişimlerine karşı tepkisini değiştirir ve plazma membran bütünlüğü olumsuz etkilenir. Dondurulan sperm çözülmesi ve kriyoprotektanın ortamdaki uzaklaştırılması sürecinde de oluşan ozmotik basınç değişiklikleri plazma membran bütünlüğünde bozukluklara sebep olmaktadır. Bu süreçte doğru kriyoprotektan kullanımı ve uygun çözülme protokollerinin uygulanması, sperm hücrelerinin canlılığını ve fonksiyonlarını korumak için kritik öneme sahiptir (Songsasen ve Leibo, 1997; Koshimoto ve Mazur, 2002).

Fare sperminin dondurulmasında farenin genetik kökeni etkilidir. İnbred türlerin spermi outbred türlerin spermine göre çözüm sonrasında daha düşük canlılığa sahiptir. Kawase ve ark. (2004) yaptığı çalışmada dondurulmuş çözülürmüş sperm ile IVF yapılmış, outbred türlerde daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir.

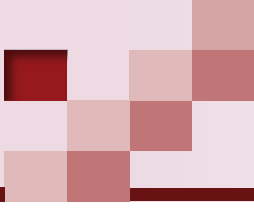
Fare sperminin dondurulmasında günümüze kadar birçok yöntem ve hücre içi ve hücre dışı birçok kriyoprotektan farklı çalışmalarda denenmiştir. Diğer memeli türlerinden farklı olarak Raffinoz/ Yağsız Süt Tozu sulandırıcısı epididimal fare sperminin dondurulmasında 20oC/ dk hızında en iyi sonuçları verdiği birçok çalışmacı tarafından gösterilmiştir (Sztejn ve ark., 2001; Nakagata ve ark., 2000; Tada ve ark., 1993; Tada ve ark., 1990; Thornton ve ark., 1999).

Takeo ve Nakagata' nın (2010) yaptığı çalışma, farelerde kriyoprezervasyonun başarılı bir şekilde uygulanması için gereken teknik ayrıntılara ışık tutar (Şekil 2).

Fare sperminin kriyoprezervasyonu üzerine son beş yılda yapılan bazı çalışmaların özetleri Tablo 1'de sunulmuştur.



Şekil 2: Şekilde, Takeo ve Nakagata'nın (2010) fare sperminin kriyoprezervasyonu ve *in vitro* fertilizasyonu (IVF) şematik anlatımı **a**) Kauda epididimlerin toplanması **b**) Epididimlerin 120 µL koruyucu ajan (CPA) içerisine alınarak makasla parçalanması **c**) Hazırlanan sperm süspansiyonunun alikotlara bölünerek 0,25 ml'lik payetlere aktarılması **d**) Payetlerin 10 dakika boyunca sıvı azot (LN₂) buharında soğutulup ardından sıvı azot tankına daldırılması **e**) Örneklerin sıvı azot tankında süresiz olarak saklanması **f**) Depolanan örneklerin tanktan alınıp 37 °C'de 10 dakika boyunca su banyosunda çözülmesi **g**) 10 µL sperm süspansiyonunun, 90µL'lik Metil-β-Siklodekstrin (MBCD) katılmış bir modifiye edilmiş Krebs-Ringer bikarbonat solüsyonu (THY) medyumuna ile 37 °C'de 30 saniye inkübe edilmesi **h**) Motil ve motil olmayan spermatozoonların ayrılması ve motil spermatozoonların toplanması **i**) Toplanan Sperm süspansiyonunun, kumulus-oozit kompleksleri (KOK) ile birlikte 90 µL HTF (human tubal fluid) solüsyonunda 5-6 saat boyunca inkübe edilmesi ve döllenmenin şekillenmesi (IVF; In vitro fertilizasyon)



Tablo 1. Fare Sperminin Kriyoprezervasyonu Üzerine Son 5 Yılda Yapılmış Bazı Önemli Çalışmalar

ARAŞTIRMACI	YIL	ARAŞTIRMANIN AMACI	SULANDIRICI	SONUÇ
Rezaei ve ark.	2020	Fare sperminin dondurulmasında sulandırıcıya L-Karnitin ilavesinin çözdürme sonrası akrozom ve kromatin bütünlüğü, oksidatif stres ve apoptoz üzerindeki etkisinin araştırılması	%18 raffinöz+%3 yağsız süt tozu içeren sperm sulandırıcısına 2.5 ve 5mM L-Karnitin	Sonuç olarak L-Karnitin oksidatif stresin zararlı etkilerinin azalttığından sperm kalite parametrelerini artırdığı, 5mM L-Karnitin kromatin bütünlüğü açısından daha iyi sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.
Mochida ve ark.	2021	Fare sperminin kolay ve hızlı şekilde dondurulması	%20 raffinöz solüsyonu	Kauda epididimisten alınan örneklerin % 20 raffinöz solüsyonunda, -80 °C de, 1 ay %51, 3 ay bekletilmesi halinde %25 fertilizasyon yeteneklerinin olduğunu buda dünyanın her yerindeki yüksek genetik özelliklere sahip fare depolarının acil durumlara karşı geçici olarak korunabilecek bir metod olduğunu bildirmişlerdir.
Yıldız ve Koçak	2023	Fare sperminin dondurulabilirliği üzerine Ferulik asit, Triptofan ve L-Glutamin' in etkisi	%18 raffinöz+%3 yağsız süt tozu içeren sperm sulandırıcısına Ferulik asit (0,1mM, 1 mM ve 10 mM), Triptofan (5 mM, 25 mM ve 50 mM) ve L-Glutaminin (10 mM, 50 mM ve 100 mM)	Fare sperm sulandırıcısına 10 mM L-Glutamin ilavesinin spermatolojik özellikler üzerinde olumlu etkilerinin olduğu, Ferulik asit ilavesinin sperm kalite parametrelerine olumlu etki yapmadığı hatta 10 mM Ferulik asitin toksik etki yaptığı ve Triptofan ilavesinin olumlu etki yapmadığını bildirmişlerdir.
Yıldız ve Erol	2024	Fare sperm sulandırıcısına düşük yoğunluklu lipoprotein ilavesinin dondurma çözdürme sonrası sperm kalitesi ve nükleer DNA kalitesi üzerine etkisi	%18 raffinöz , % 3 yağsız süt içerisine farklı konsantrasyonlarda LDL (% 2.5, %5.0, %7.5, %10)	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 kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Sonuç ve Öneri

Sperm, embriyo, kan ve doku gibi fare materyallerinin dondurulmuş olarak stoklanması ve taşınması, canlı hayvan sevkياتına kıyasla etik ve lojistik açıdan daha avantajlıdır. Sperm dondurularak sevk edilmesi hayvan refahı sorunlarını en aza indirir ve canlı hayvan taşımacılığı ile ilgili gümrük düzenlemelerini kolaylaştırır (Raspa ve ark., 2017). Fare sperm ve embriyolarının -196°C sıcaklıkta sıvı azot içerisinde arşivlenmesi geleneksel bir yöntem haline gelmiştir. Ancak gelişen dondurma ve çözdürme protokollerinin uygulanması nedeniyle sperm dondurulması daha kullanışlı bir alternatif olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca dondurulmuş sperm dondurulmuş embriyoya kıyasla dondurma sonrasındaki sıcaklık değişimlerine daha az duyarlıdır. Fare sperminin işlenmesi ve uzun süreli saklanması alanında yapılan araştırmalar hala devam etmektedir. Araştırma ve uygulamalar için değerli genetik özelliklere sahip farelerin genetik Güvenç ve Yıldız, 2024

kaynaklarını korumak ve genetik kapasitesini artırmak amacıyla sperm kriyoprezervasyonu günümüzde ve gelecekte önemli bir genetik yapıyı koruma kaynağı olacaktır. Bu alanda daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

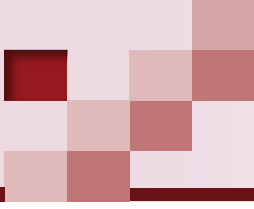
Teşekkür: Bu derleme 'Fare ve Rat Spermasının Kriyoprezervasyonu' isimli doktora seminerinden üretilmiştir.

Mali Destek: Bu çalışma herhangi bir finansman kuruluşundan/sektöründen hibe/destek almamıştır.

Etik Beyanı: Bu çalışmanın yapılmasında Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul (HADYEK) İzin Belgesi gerekmemektedir.

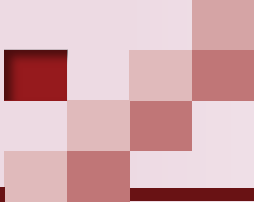
Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları: Tüm yazarlar derleme çalışmasının yazılması ve düzenlenmesinde eşit oranda katkıda bulunmuşlardır.



Kaynaklar

1. Agca, Y., Gilmore, J., Byers, M., Woods, E. J., Liu, J., & Critser, J. K. (2002). Osmotic characteristics of mouse spermatozoa in the presence of extenders and sugars. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1493-1501. Doi: 10.1095/biolreprod.102.005579
2. Akman, O. (2007). Swiss albino ırkı farelerde sperma kalitesinin belirlenmesi amacıyla hos testi sonuçları ve diğer spermatolojik parametreler arasındaki ilişkinin araştırılması. Selçuk Üniv.Sağ.Bil.Enst. Doktora tezi. 2007
3. Anderson, R. A., Oswald, C., Willis, B. R., & Zaneveld, L. J. D. (1983). Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice. *Reproduction*, 68(1), 1-7. Doi:10.1530/jrf.0.0680001
4. At, P. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol. Adv.*, 14, 127-149.
5. Bucak, M. N., & Tekin, N. (2007). Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, 73(1-3), 103-108. Doi: 10.1016/J.Smallrumres.2006.12.001
6. Cardullo, R. A., & Baltz, J. M. (1991). Metabolic regulation in mammalian sperm: mitochondrial volume determines sperm length and flagellar beat frequency. *Cell motility and the cytoskeleton*, 19(3), 180-188. Doi: 10.1002/Cm.970190306
7. Chang, M. C. (1984). The meaning of sperm capacitation. A historical perspective. *Journal of andrology*, 5(2), 45-50. Doi: 10.1002/J.1939-4640.1984.Tb00775.X
8. Chulavatnatol, M. (1982). Motility initiation of quiescent spermatozoa from rat caudal epididymis: effects of pH, viscosity, osmolality and inhibitors. *International Journal of Andrology*, 5(4), 425-436. Doi: 10.1111/J.1365-2605.1982.Tb00272.X
9. Curry, M. R., & Watson, P. F. (1994). Osmotic effects on ram and human sperm membranes in relation to thawing injury. *Cryobiology*, 31(1),39-46. Doi: 10.1006/Cryo.1994.1005
10. Darszon, A., Espinosa, F., Galindo, B., Sánchez, D., & Beltrán, C. (2002). Regulation of sperm ion currents. In *Fertilization* (pp. 225-264). Academic Press. Doi:10.1016/B978-012311629-1/50009-7
11. De Leeuw, F. E., De Leeuw, A. M., Den Daas, J. H. G., Colenbrander, B., & Verkleij, A. J. (1993). Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, 30(1), 32-44. Doi: 10.1006/Cryo.1993.1005
12. Dewit, M., Marley, W. S., & Graham, J. K. (2000). Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. *Cryobiology*, 40(1), 36-45. Doi: 10.1006/Cryo.1999.2219
13. Edashige, K., Yamaji, Y., Kleinhans, F. W., & Kasai, M. (2003). Artificial expression of aquaporin-3 improves the survival of mouse oocytes after cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 68(1), 87-94. Doi: 10.1095/biolreprod.101.002394
14. Gao, D. Y., Ashworth, E., Watson, P. F., Kleinhans, F. W., Mazur, P., & Critser, J. K. (1993). Hyperosmotic tolerance of human spermatozoa: separate effects of glycerol, sodium chloride, and sucrose on spermolysis. *Biology of reproduction*, 49(1), 112-123. Doi: 10.1095/Biolreprod49.1.112
15. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan J.P.(1990). Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl*, 11: 73-88. Doi: 10.1002/J.1939-4640.1990.Tb01583.X
16. Kasai, M. (2002). Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reproductive Medicine and Biology*, 1, 1-9.
17. Katkov, I. I., Katkova, N., Critser, J. K., & Mazur, P. (1998). Mouse spermatozoa in high concentrations of glycerol: chemical toxicity vs osmotic shock at normal and reduced oxygen concentrations. *Cryobiology*, 37(4), 325-338. Doi: 10.1006/Cryo.1998.2128
18. Kawase, Y., Aoki, Y., Kamada, N., Jishage, K. I., & Suzuki, H. (2004). Comparison of fertility between intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization with a partial zona pellucida incision by using a piezo-micromanipulator in cryopreserved inbred mouse spermatozoa. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 43(1), 21-25.
19. Koçak, G., & Yildiz, C. (2024). The Effects of Ferulic Acid, Tryptophan, and L-Glutamine on the Cryopreservation of Mouse Spermatozoa. *Biopreservation and Biobanking*, 22(3), 286-293. Doi: 10.1089/Bio.2023.0067
20. Koshimoto, C., Gamliel, E., & Mazur, P. (2000). Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. *Cryobiology*, 41(3), 204-231. Doi: 10.1006/Cryo.2000.2281
21. Koshimoto, C., & Mazur, P. (2002). Effects of warming rate, temperature, and antifreeze proteins on the survival of mouse spermatozoa frozen at an optimal rate. *Cryobiology*, 45(1), 49-59. Doi: 10.1016/S0011-2240(02)00105-0
22. Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., BAILEYS, J. L., & Sullivan, R. (2000). Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *Journal of andrology*, 21(5), 700-707. Doi: 10.1002/J.1939-4640.2000.Tb02138.X
23. Li, H., Hung, P. H., & Suarez, S. S. (2015). Ejaculated mouse sperm enter cumulus-oocyte complexes more efficiently in vitro than epididymal sperm. *PLoS One*, 10(5), e0127753. Doi: 10.1371/Journal.Pone.0127753
24. Li, M. W., Glass, O. C., Zarrabi, J., Baker, L. N., & Lloyd, K. K. (2016). Cryorecovery of mouse sperm by different IVF methods using MBDCD and GSH. *Journal of fertilization in vitro*, 4(2). Doi: 10.4172/2375-4508.1000175
25. Mazur, P. (1990). Equilibrium, quasi-equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell biophysics*, 17, 53-92.
26. Mochida, K., Hasegawa, A., Shikata, D., Itami, N., Hada, M., Watanabe, N., ... & Ogura, A. (2021). Easy and quick (EQ) sperm freezing method for urgent preservation of mouse strains. *Scientific Reports*, 11(1), 14149.
27. Nakagata, N. (2000). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Mammalian Genome*, 11(7), 572-576. Doi: 10.1007/s003350010109
28. Nakatsukasa, E., Kashiwazaki, N., Takizawa, A., Shino, M., Kitada, K., Serikawa, T., ... & Nakagata, N. (2003). Cryopreservation of spermatozoa from closed colonies, and inbred, spontaneous mutant, and transgenic strains of rats. *Comparative medicine*, 53(6), 639-641.
29. Noyles, E. E., Thompson, K. A., & Storey, B. T. (1997). Water permeability, Lp, of the mouse sperm plasma membrane and its activation energy are strongly dependent on interaction of the plasma membrane with the sperm cytoskeleton. *Cryobiology*, 35(1), 79-92. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2033
30. Parks, J. E., & Lynch, D. V. (1992). Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29(2), 255-266. Doi: 10.1016/0011-2240(92)90024-V



31. Pedro, P. B., Zhu, S. E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, K., & Kasai, M. (1997). Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology*, 35(2), 150-158. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2034
32. Pickett, B. W., & Amann, R. P. (1993). Cryopreservation of semen. *Equine reproduction*, 775, 780.
33. Raspa, M., Guan, M., Paoletti, R., Montoliu, L., Ayadi, A., Marschall, S., ... & EMMA/Infrafrontier Technical Working Group. (2017). Dry ice is a reliable substrate for the distribution of frozen mouse spermatozoa: A multi-centric study. *Theriogenology*, 96, 49-57. Doi: 10.1016/J.Theriogenology.2017.04.003
34. Rezaei, N., Mohammadi, M., Mohammadi, H., Khalatbari, A., & Zare, Z. (2020). Acrosome and chromatin integrity, oxidative stress, and expression of apoptosis-related genes in cryopreserved mouse epididymal spermatozoa treated with L-Carnitine. *Cryobiology*, 95, 171-176. Doi: 10.1016/J.Cryobiol.2020.03.006
35. Rudolph, A. S., & Crowe, J. H. (1985). Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology*, 22(4), 367-377. Doi: 10.1016/0011-2240(85)90184-1
36. Sağırkaya, H. (2001). Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması (Doctoral dissertation, Bursa Uludağ University (Turkey)).Uludağ Üniv.Sağ.Bil.Enst. Doktora tezi. 2001
37. Samper, J. C., Hellander, J. C., & Crabo, B. G. (1991). Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 44, 107-114.
38. Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Cryobiology*, 35(3), 240-254. Doi: 10.1006/Cryo.1997.2048
39. Songsasen, N., & Leibo, S. P. (1998). Live mice from cryopreserved embryos derived in vitro with cryopreserved ejaculated spermatozoa. *Comparative Medicine*, 48(3), 275-281.
40. Storey, B. T., Noiles, E. E., & Thompson, K. A. (1998). Comparison of glycerol, other polyols, trehalose, and raffinose to provide a defined cryoprotectant medium for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 37(1), 46-58. Doi: 10.1006/Cryo.1998.2097
41. Sirat, M. P., Sinha, A. K., Singh, B. K., & Prasad, R. L. (1996). Effect of cryoprotectants on release of various enzymes from buck spermatozoa during freezing. *Theriogenology*, 45(2), 405-416. Doi: 10.1016/0093-691x(95)00377-K
42. Si, W., Benson, J. D., Men, H., & Critser, J. K. (2006). Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, 53(3), 336-348. Doi: 10.1016/J.Cryobiol.2006.09.001
43. Spencer, G. International Team of Researchers Assembles Draft Sequence of Mouse Genome. <https://www.genome.gov/10002983/2002-release-draft-sequence-of-mouse-genome>, Erişim Tarihi: 03.01.2020. 2002.
44. Steinmann, H. (1996). Use of trehalose as a cryoprotectant in the freezing of stallion semen. A laboratory study.
45. Szein, J. M., Noble, K., Farley, J. S., & Mobraaten, L. E. (2001). Comparison of permeating and nonpermeating cryoprotectants for mouse sperm cryopreservation. *Cryobiology*, 42(1), 28-39. Doi: 10.1006/Cryo.2001.2300
46. Tada, N., Sato, M., Yamanoi, J., Mizorogi, T., Kasai, K., & Ogawa, S. (1990). Cryopreservation of mouse spermatozoa in the presence of raffinose and glycerol. *Reproduction*, 89(2), 511-516. Doi: 10.1530/jrf.0.0890511
47. Tada, N. (1993). Effect of pre-freezing equilibration and post-thawing centrifugation on the fertilizing capacity of frozen mouse epididymal spermatozoa. *Cryo-Letters*, 14, 195-206.
48. Takeo, T., & Nakagata, N. (2010). Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl-β-cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Laboratory animals*, 44(2), 132-137. Doi: 10.1258/La.2009.009074
49. Tecirlioglu, R. T., Hayes, E. S., & Trounson, A. O. (2002). Semen collection from mice: electroejaculation. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(6), 363-371. Doi: 10.1071/RD02015
50. Thornton, C. E., Brown, S. D., & Glenister, P. H. (1999). Large numbers of mice established by in vitro fertilization with cryopreserved spermatozoa: implications and applications for genetic resource banks, mutagenesis screens, and mouse backcrosses. *Mammalian Genome*, 10(10), 987-992. Doi: 10.1007/s003359901145
51. Varisli, O., Uguz, C., Agca, C., & Agca, Y. (2009). Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Animal Reproduction Science*, 110(3-4), 256-268. Doi: 10.1016/J.Anireprosci.2008.01.012
52. Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*, 7(4), 871-891. Doi: 10.1071/RD9950871
53. Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3
54. Woelders, H. (1997). Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Veterinary Quarterly*, 19(3), 135-138. Doi: 10.1016/S0378-4320(00)00099-3
55. Wongtawan, T., Saravia, F., Wallgren, M., Caballero, I., & Rodríguez-Martínez, H. (2006). Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semendoses. *Theriogenology*, 65(4)773-787. Doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.07.033
56. Wowk, B., Leitl, E., Rasch, C. M., Mesbah-Karimi, N., Harris, S. B., & Fahy, G. M. (2000). Vitrification enhancement by synthetic ice blocking agents. *Cryobiology*, 40(3), 228-236. Doi: 10.1006/cryo.2000.2243
57. Yamashiro, H., & Eimei, S. (2012). Cryopreservation of rat sperm. *Current Frontiers in Cryobiology*, 165-178.
58. Yıldız, C., Erol, İ. (2024). The Effects on Post-Thaw Sperm Quality and Nuclear DNA Integrity of Supplementation of Low-Density Lipoprotein to Freezing Extender in the Mouse. *Van Veterinary Journal*, 35(1), 94-100. Doi: 10.36483/vanvetj.1417880
59. Yıldız, C., Ottaviani, P., Law, N., Ayearst, R., Liu, L., & McKerlie, C. (2007). Effects of cryopreservation on sperm quality, nuclear DNA integrity, in vitro fertilization, and in vitro embryo development in the mouse. *Reproduction*, 133(3), 585-595. Doi: 10.1530/Rep-06-0256

Derleme makalesi / Review article

Köpeklerde hemogram parametrelerinin davranış üzerine etkisi

Halil Yavuz^{1a}, Duygu Arslan^{2b*}, Yavuzkan Paksoy^{3c}¹ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya, Türkiye.² Alfa Vet Veteriner Hekim Muayenehanesi, Hatay, Türkiye.³ Necmettin Erbakan Üniversitesi, Konya Ereğli Kemal Akman Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Konya, Türkiye.

The effect of haemogram parameters on behaviour in dogs

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

18.05.2024

Revizyon/Revised:

31.08.2024

Kabul / Accepted:

04.10.2024

ORCIDS:

^a 0000-0001-9226-2937^b 0009-0000-9803-5452^c 0000-0002-0935-7693

Abstract:

Among the first domestic animals, dogs are a member of the Canidae family. They are the most preferred pet animal because of their extraordinary bond with humans and their high level of protection. As with other living things, dogs have their own unique behaviors. They can exhibit different behaviors in breeds within a species. They can show normal behaviors such as feeding, sleeping, resting, breeding, possessing and socializing, and abnormal behaviors such as growling, biting and barking. The occurrence of abnormal behavior is due to many causes. Bacterial, viral and parasitic infections are among them. Detection of infections by hemogram values is very important for diagnosis and treatment. In this study, behavioral changes that occur when hemogram values increase or decrease will be examined.

Keywords: Dog, Behaviour, Haemogram, Stereotype

Köpeklerde hemogram parametrelerinin davranış üzerine etkisi

Özet:

İlk evcil hayvanlar arasında bulunan köpekler Canidae ailesinin bir üyesidir. İnsanlar ile kurdukları olağanüstü bağ ve koruma özelliklerinin üst düzeyde olması sebebi ile en çok tercih edilen pet hayvanıdır. Diğer canlılarda olduğu gibi köpeklerinde kendine özgü davranışları vardır. Bir tür içerisinde bulunan ırklarda farklı davranışlar sergileyebilirler. Beslenme, uyuma, dinlenme, üreme, sahiplenme ve sosyalleşme gibi normal, hırlama, ısırma, havlama gibi anormal davranışlar gösterilebilirler. Anormal davranışların ortaya çıkması birçok sebebe bağlıdır. Bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonlar bu sebepler arasındadır. Enfeksiyonların hemogram değerleri ile belirlenmesi teşhis ve tedavi için çok önemlidir. Bu çalışmada, hemogram değerlerinin artması ya da azalması durumunda meydana gelen davranış değişiklikleri incelenecektir.

Anahtar kelimeler: Köpek, Davranış, Hemogram, Stereotip

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: vet.duyguarslan@icloud.com

How to cite this article: Yavuz H, Arslan D & Paksoy Y (2024). Köpeklerde hemogram parametrelerinin davranış üzerine etkisi. *Antakya Vet. Bil. Derg.*, 3(2), 58-63.



Giriş

Köpeğin Tarihçesi

Köpekler, Canidae familyasına (ailesi) ait olan birbirinden değişik vücut yapısı ve boyutlara sahip, 400'ün üzerinde çeşitli ırk kapsayan, evcil, etobur memeli hayvanlardır. İlk evcil hayvanlar köpeklerdir. Köpekler (*C. lupus familiaris*), kurtlardan (*Canis lupus*) evrimleşmişlerdir (Wang ve Richard, 2010).

Paleontoloji ve arkeoloji araştırmalarına göre Canidae familyasına ait 36 tür olduğu bilinmektedir. Bu türler arasında kurtlar, köpekler, tilkiler ve çakallar yer almaktadır. Bunun yanı sıra bunların ortak atasının (Miacidid) yaklaşık 60 milyon yıl önceye dayandığı düşünülmektedir. Miacididler, kısa boylu, uzun yapılı, bacakları kısa, kulakları dik, uzun kuyruklu, ağaçta yaşayan, gelincik ve sansara benzeyen etçil hayvanlardır. Köpek türlerinin, Miacidid olarak bilinen bu hayvanın Cynodictis'e evrimleşmesi sonucu ortaya çıktığı varsayılmaktadır. Cynodictis zamanla evrimleşerek Afrika ve Avrasya'da 2 cins ortaya çıkmıştır. Avrasya'daki adına Tomarctus denilen bu cinsin kurtlar, köpekler ve tilkilerin öncüsü olduğu bilinmektedir (Coppinger, 2001; Klein, 2016).

Yaklaşık 13 bin yıl önce köpekler insanların av arkadaşı, dostu ve koruyucusu olmuştur. Köpek türlerinin farklı gereksinimler için evrimleşmesinde ve farklı köpek türlerinin ortaya çıkmasında insanların önemli rolü vardır. Örneğin; 8 bin yıl önce evcilleştirilen çiftlik hayvanlarına çobanlık yapması için köpekler kullanılmıştır. İlk köpek türü keskin görüş ve koku alma yeteneğine sahip av köpekleridir. Antik Mısır'da köpekler kutsal sayılırken, günümüzde bekçi, yük hayvanı, ev arkadaşı, arama – kurtarma ve yenilebilen hayvan olarak birçok amaçla yetiştirilmektedir (Wingfield-Hayes, 2002).

Araştırmalara göre, evcil köpeklerin Asya'nın doğusu ile Avrupa olmak üzere 2 farklı bölgede evcilleştirildiği düşünülmektedir. Genetik veriler incelendiğinde köpeklerin evcilleştirilmesinin 19 bin yıl önce Avrupa'da başladığı görüşü savunulmuştur. Asya'nın doğusunda evcilleştirilen köpeklerin

ise ortalama 10 bin yıl önce Batı'ya getirilerek Avrupalı köpeklerin yerine geçtiği söylenmiştir (Winter, 2013; Kartal, 2016).

Davranışın Tarihçesi

Canlıların çevrelerinden gelen etkilere karşı sergiledikleri tepkiler bütününe davranış denir. Davranış biliminin tarihçesi henüz tam olarak bilinmemektedir. Davranışlar incelenirken karşılaştırmalı davranış bilimi olan etolojiden yararlanılmıştır. 19. yüzyılın başlarında insanlar hayvan davranışlarını merak etmeye başlamışlar fakat kapsamlı çalışmalar 1950'lerden sonra yapılmıştır. Hayvan davranışlarının yeteri kadar bilinmemesi ve incelenmemesi, insan davranışlarını araştırmak için harcanan zamandan kaynaklıdır. Bu sebeple, hayvan davranışlarının insan davranışları ile benzer olabileceği düşünülerek, kolay bir çözüm bulunmuştur (Savaş ve Yurtman, 2008). Davranışların hayvanların refah seviyeleri ve hayatta kalma sürelerini etkilediğini savunan ilk kişi Charles Darwin olarak kabul edilir. Conrad Lorenz, Nicolaas Tinbergen ve Carl woon Frisch yaptıkları davranış çalışmaları ile etoloji bilimine yön vererek 1973 yılında tıp ve fizyoloji Nobel ödülünü ortak olarak almışlardır (Todes, 2003). Hayvanlar bir takım sebeplerle evcilleştirilmiş, daha iyi ırklar elde etmek için seleksiyona uğramışlardır. Böylece, daha kaliteli ırklardan, daha fazla fayda sağlanmıştır. Bu nedenle, hayvanlarla insanlar arasındaki etkileşime önem verilerek, hayvan davranışları incelenmiştir (Paksoy, 2024). İdrar, kan ve ter gibi vücut sıvılarının davranışın oluşmasında etkili olduğu bilinmektedir. Başka bir deyişle endokrin ve sinir sistemi iş birliği içinde çalışarak davranışları yansıtır (Özdin ve Mundan, 2018). Sinir sistemi ve biyokimyasal analizler incelenerek hayvanların normal davranışları belirlenebilir. Normal davranışların belirlenmesi, hayvanda meydana gelen anormal davranışın kısa sürede fark edilerek kolayca tedavi olmasını sağlar. Beden sıvıları bir takım hastalıklara bağlı olarak değişikliğe uğrar. Bu değişiklikler, hekimler için çok önemli parametrelerdir (Özdin ve Mundan, 2018). Metabolizmadaki biyokimyasal değişikliklerin takip edilmesi ve problemin teşhis edilmesi, laboratuvar çalışmaları sayesinde olur. Bu değişimler hayvanların davranışları ile ilgili bilgilere ulaşılmasını sağlar (Sönmez, 2013).

Hayvanların etkilere karşı verdiği tepkiler davranış gibi gözle görülebilen vücut hareketleri formunda ya da duygu ve düşünceler gibi gözle görülemeyen formlarda da olabilir. Psikoloji bilimi canlıların gözle görülebilir ve ölçülebilir davranışlarını inceler. Bu bilim dalı endokrinolojik testlerin

Biyolojik sınıflandırma

Âlem:	Animalia
Şube:	Chordata
Sınıf:	Mammalia
Takım:	Carnivora
Familya:	Canidae
Oymak:	Canini
Alt oymak:	Canina
Cins:	Canis
Tür:	<i>C. lupus</i>
Alt tür:	<i>C. l. familiaris</i>



sonucunu inceleyerek, ruhsal tepkiler gibi anormal davranışları da inceler. Bu davranışlar incelenirken hiçbir davranış tek başına incelenmez, canlıdaki davranışlar bir bütün olarak ele alınır (Noyan, 2007).

Normal davranışlar; hayvanların rutin olarak yaşamsal faaliyetlerini gerçekleştirmek için sergiledikleri davranışlardır. Beslenme, avlanma, uyuma, dinlenme, üreme, analık, sosyalleşme ve oyun oynama normal davranışlara örnek gösterilebilir (Paksoy ve Arslan, 2023).

Hayvanların bir takım hastalık ya da rahatsızlıklar sonucu sergiledikleri normal olmayan davranışlara ise anormal davranışlar denir. Isırma, hırlama (Şekil 1), diş gösterme, tekme atma, saldırganlık, korku, aşırı havlama, tırmalama ve kendi etrafında dönme anormal davranışlara örnek gösterilebilir (Paksoy ve Gürle Albayrak, 2023).



Şekil-1. Hırlayan köpek anormal davranışı

vardır. Literatürde (PubMed) köpek kanı ile ilgili ilk yayın Busch ve Van Bergen (1902) tarafından yayınlanmıştır. Bunun yanı sıra köpeklerin hemogram değerleri ile ilgili ilk çalışmaya 1957 yılında rastlanmıştır. Zamanla teknolojideki gelişmeler doğrultusunda otomatik hemogram cihazları geliştirilmiştir.

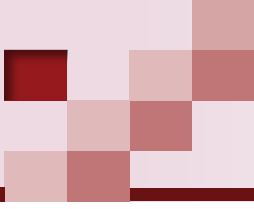
Köpeklerde Normal Hemogram Değerleri

Hemogram ve biyokimya parametrelerinin değerlendirilmesi hayvanlarda görülen klinik bulguların teşhisi ve tedavisinde veteriner hekimlere yol gösterdiği için çok önemlidir. (Ogbu ve ark., 2021). Klinik biyokimya, biyokimyasal testlerin uygulanması ve sonuçların okunması ile ilgilenen bir iş dalıdır. Günümüzde teşhis ve tedavinin değerlendirilmesi ile karar verilmesini laboratuvar sonuçları %65 oranında etkiler (Sönmez, 2013).

Hayvanlarda kan değerleri tür, yaş, ırk, cinsiyet, mevsim, yetersiz beslenme, hastalıklar ve çevre koşullarına göre değişebilmektedir. Araştırmalara göre, farklı ırk köpeklerde vücutta dolaşan kan hacmindeki ortalama alyuvar sayısı genel olarak birbirine yakındır. Genç hayvanlar yaşlı hayvanlardan daha fazla alyuvar sayısına sahiptir. Kandaki alyuvar (eritrosit) hücreleri içerdiği hemoglobin ile işlevini gerçekleştirir. Sağlık problemi olmayan hayvanlarda alyuvar sayısı ile hemoglobin miktarı arasında pozitif bir denge vardır. Hemoglobin alyuvarlara kırmızı rengini verir ve oksijeni bağlayarak kanda oksijen taşınmasını sağlar. Köpeklerde normal hemoglobin değeri 12-18 g/dl olarak bilinmektedir. Hücre içi sıvıların dengesini sağlayan başlıca iyonu K^+ , hücre dışı sıvılarınki ise Na^+ dur. Bu sıvı dengesinin korunması Na-K pompası sayesinde olmaktadır. Ca^{++} ise hücredeki dengeyi sağlayan, lökositlerin fagositoz yeteneğini arttıran, salgı bezlerinde salgılanmayı ve kas kasılmasını sağlar (Keskin ve ark., 1994). Köpeklerde normal hematokrit değeri %37-55 arasında değişmektedir. Hayvanlarda hemogram değerlerinde beyaz kan hücreleri sayısının genel olarak artması, içerdiği her bir tip hücre sayısının eşit oranda arttığı anlamına gelmez. Farklı hastalıklara ve hastalıkların seyrine göre beyaz kan hücre tiplerinde artış değişkendir. Kanda eozinofil sayısı ise alerji, anafaksi, dermatolojik rahatsızlıklar ve paraziter enfestasyonlarda artmaktadır. Beyaz kan hücreleri vücudun savunma sisteminde görev alır. Köpeklerde beyaz kan hücrelerindeki referans değerler Tablo-1'de verilmiştir (Eksen ve ark., 1992). Kanın şekilli elemanlarındaki sedimentasyon hızı normalde yaş, gebelik, sıcaklık ve cinsiyete bağlı değişkendir. Fakat birçok hastalıkta sedimentasyon hızı farklılık göstermektedir.

Köpeklerde Hemogram Değerlerinin Tarihçesi

Kan hücreleri sayımı 17. yüzyılda Leeuwenhoek'un mikroskobu keşfi ile başlamış ve 1950'lere kadar sürmüştür (Aydoğdu, 2002). 1950 yılında, ilk kez lökosit ve eritrositlerin sayımını yapabilen bir alet Wallace Coulter tarafından geliştirilmiştir (Yıldız, 2001). Hayvanlar üzerinde kan tahlilleri ile ilgili çalışmalar ise 20. yüzyıl ile başlamış, zaman içerisinde gelişmiş ve dünya çapında rutin olarak yapılır hale gelmiştir (Alpan ve Ertuğrul 1991). Hemogram değerleri, uzun yıllardan beri veteriner hekimlikte yaygın olarak kullanılan tetkiklerden birisidir. Veteriner hekimlikte, hematolojik muayeneler; bakteri, virüs ve parazitlerin hayvanlarda neden olduğu hastalıkların erken teşhisi, etiyojisi, prognozu ve uygulanan tedavinin gidişatı hakkında bilgi vermesi bakımından önemli bir ölçüttür. Veteriner hekimler anamnez ve fiziki muayene ile hastalıklar hakkında önemli fikirler edinse de kan hastalıklarının kesin tanısında laboratuvar testlerine ihtiyaç



Araştırmalara göre, yangı ve enfeksiyon kaynaklı hastalıklarda eritrositlerin çökme hızında artış olduğu gözlenmektedir. Trombositler kanın pıhtılaşmasından sorumludur. Kanın akışkanlığı, eritrositlerin şekil ve büyüklüğündeki artış, kanda CO2 artması, lökosit sayısının fazla artışı, protein miktarının artması ve plazma su oranının azalması ile artar (Paltrinieri ve ark., 2024; Pekmezci ve Çolak, 2021). RDW eritrositlerin dağılım genişliğini ifade etmektedir. RDW, dolaşım sistemindeki eritrositlerin (RBC) büyüklük ve yoğunluk farklılıklarının göstergesidir. Köpeklerde görülen plastik ve aplastik anemilerde ya da demir eksikliğinde RDW değeri artış göstermektedir (Martinez ve ark., 2019).

Tablo-1. Köpeklerde normal hematolojik

Test	Birimler	Köpek
WBC	10x3/mm ³	6.0-17.0
RBC	10x6/mm ³	5.5-8.5
Hemoglobin	g/dl	12.0-18.0
Hematokrit	%	37-55
MCV	fl	60-77
MCH	pg	19.5-26
MCHC	%	32-36
PLT (Trombosit)	10x3/mm ³	200-500
Nötrofil	%	60-77
Lenfosit	%	12-30
Monosit	%	3-10
Eosinofil	%	2-10
Bazofil	%	0-1
Retikülosit	%	0.5-1.5

Köpeklerde Hemogram Değerlerinin Değişmesi Sonucu Oluşan Anormal Davranışlar

Köpeklerde görülen davranış problemleri; agresyon, korku, kaygı, stres, obsesif kompulsif bozukluklar, cinsiyet ve yaşlanma ile ortaya çıkan davranış problemleri gibi çok geniş bir alandan oluşmaktadır (Voith ve ark., 1992). Köpeklerde en sık tanımlanan davranış sorunlarını saldırganlık, uygunsuz eliminasyon ve ses çıkarma olarak tanımlanmaktadır.

Erkek köpekler arası saldırganlık, testosteron hormonunun fazla salgılanmasıyla ilgili olarak görülen bir davranıştır. (Blackshaw, 1991; Depelchin, 1957). Anemi görülen köpeklerde klinik belirtilerle birlikte halsizlik, kanın oksijen taşıma kapasitesi yetersiz olduğu için agresyon ve huzursuzluk, uyuşukluk, anoreksi, depresyon, hareketlerde yavaşlık, pika ve genel aktivitenin azalması sık sergilenen davranışlardandır (Özler, 2023; Paltrinieri ve ark., 2024).

Hematolojik olarak; anemi, lökopeni ve trombositopeni bulgularına rastlanan köpeklerde genellikle yeme davranışı bozukluğu görülür.

Nötrofil sayısının lenfosit sayısına oranı, sistemik inflamasyon ve stres için yeni bir hematolojik parametre olarak kabul edilmektedir (Depelchin, 1957; Zahorec, 2021). Yapılan çalışmalarda stres oluşturan faktörlerin ortamda bulunması durumunda köpeklerde davranış şekillerinde değişikliklere neden olduğu bildirilmiştir (Hennessy ve ark., 1997; Hiby ve ark., 2006).

Genel olarak köpeklerde WBC yüksekliği ile seyreden derideki anal, keselerdeki yangı-enfeksiyonlar gibi durumlarda, ilgili bölgeleri yalama davranışı gösterirler (Depelchin, 1957).

Yapılan çalışmalarda, parvo viral enteritli (Canine parvovirus) köpeklerde nötrofil ve lenfosit değeri sağlıklı köpeklere oranla daha düşük, trombosit/lenfosit oranı ortalama değeri ise yüksek olarak tespit edilmiştir. Parvo viral enterit köpeklerde huzursuzluk, anemi, halsizlik, inleme, hırlama, uyuşukluk, dehidrasyon ve halsizliğe neden olur (Pekmezci ve Çolak, 2021).

Köpeklerde etkeni *Borrelia burgdorferi* olan Lyme hastalığında ise sağlıklı köpeklere oranla nötrofil/lenfosit oranının yüksek olduğu belirtilmiştir. Lyme hastalığı köpeklerde iştahsızlık, yorgunluk, topallama ve halsizlik gibi anormal davranışlara sebep olmaktadır (Pekmezci ve Çolak, 2021).

Köpeklerde uzun süreli folik asit ve B₁₂ vitamini yetersizliğinde iştahsızlık, halsizlik, anoreksi ve nöbetler meydana gelmektedir. Hayvanlarda aşırı su tüketimi sonucu hidrostatik basınç artar, anemi ve hemoglobinüri görülür. Bu nedenle depresyon, kasılma, salya artışı, nöbet, yürüme güçlüğü, aşırı duyarlılık ve koma meydana gelmektedir (Kayar, 2013).

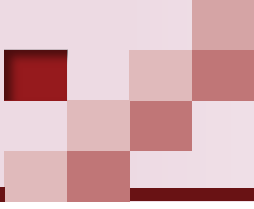
Köpeklerde babesia hastalığında uyuşukluk, ağrı, iştahsızlık, kilo kaybı, nöbet ve solunum sayısında artış görülmektedir (Kayar, 2013).

Polisitemi (alyuvar sayısındaki artış) durumunda heyecan, ağrı, dehidrasyon ve hiperaktivite görülmektedir. Lökosit artışı fizyolojik ve patolojik etkenlere bağlı şekillenebilir fakat lökosit azalışı sadece patolojik etkenlere bağlı şekillenebilmektedir (Kayar, 2013).

Köpeklerde ehrlichiosis ve distemper hastalığında anemi, iştahsızlık, halsizlik, hiperestezi ve sinirsel semptomlar meydana gelmektedir (Kayar, 2013).

Sonuç

Hayvanların davranışları incelenerek çevre koşulları uygun bir şekilde düzenlenebilir ve refah seviyeleri artırılabilir. Davranışların genetik ve çevresel faktörlerin etkisi altında



olduğu göz önünde bulundurularak, anormal davranışların sebepleri hakkında yorum yapılabilir. Hematolojik değerlerin arttığı ve azaldığı durumlarda hayvanlar farklı davranışlar sergilemektedir. Hastalıklar ve uygun olmayan çevre koşulları hayvanların anormal davranışlar sergilemesinde başlıca faktörlerdir. Bakteriyel, viral ve paraziter enfeksiyonlar hayvanlarda davranış bozukluklarının en önemli sebepleri arasındadır. Hemogram parametreleri yorumlanarak enfeksiyonların erken teşhis ve tedavi edilmesi sağlanabilir, anormal davranışların ortaya çıkmasının önüne geçilebilir.

Mali Destek: Bu araştırma herhangi bir finansman kuruluşundan destek almamıştır.

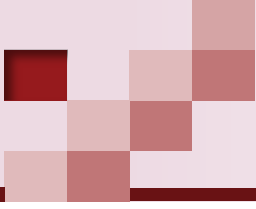
Etik Beyanı: Bu çalışmada Etik kurul iznine gerek yoktur.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Yazar Katkıları: Tüm yazarlar derleme çalışmasının yazılması ve düzenlenmesinde eşit oranda katkıda bulunmuşlardır.

Kaynaklar

- Alpan, O., & Ertuğrul, O. (1991). Kan grupları ve hayvan ıslahında kullanımı. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 31(1-2), 111-122.
- Aydoğdu, İ. (2002). Kan sayım sonuçlarını nasıl yorumlamalıyız? *Hematoloji birinci basamak kursu eğitim kitabı, Türk Hematoloji Derneği, Antalya*, 13-17.
- Blackshaw, J.K. (1991). An overview of types of aggressive behaviour in dogs and methods of treatments. *Applied Animal Behaviour Science*, 30, 351-361. Doi: 10.1016/0168-1591(91)90140-5
- Busch, F.C., & Van Bergen, C. (1902). Dog's Blood.-Differential Counts of Leucocytes. *The Journal of medical research*, 8(2), 408-414.
- Coppinger, R. (2001). *Dogs: a Startling New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. New York: Scribner, 352.
- Depelchin, A. (1957). L'hémogramme Normal Des Espèces Bovine et Canine [A normal hemogram of the Bovine and Canine Species]. *Comptes Rendus Des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, 151(8-9): 1619-1621.
- Eksen, M., Durgun, Z., Dik, B., & Keskin, E. (1992). Effect of Treatment On Haematological Values in the Dogs Infected with *Dirofilaria immitis*. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 8, 2, 51-54.
- Hennessy, M.B., Davis, H.N., Williams, M.T., Mellott, C., & Douglas, C.W. (1997). Plasma Cortisol Levels of Dogs at a County Animal Shelter. *Physiology & Behavior*, 62 (3): 485-490. Doi: 10.1016/S0031-9384(97) 80328-9
- Hiby, E.F., Rooney, N.J., & Bradshaw, J.W. (2006). Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. *Physiology & Behavior*, 89 (3), 385-391. Doi: 10.1016/j.physbeh.2006.07.012
- Kartal, E.C. (2016). Köpekler birden fazla coğrafyada, bağımsız olarak evcilleştirilmiş olabilir! 17.06.2016. [https://evrimagaci.org/kopekler-birden-fazla-cografyada-bagimsiz-olarak-evcillestirilmis-olabilir-4420?srsltid=AfmBOorbh-](https://evrimagaci.org/kopekler-birden-fazla-cografyada-bagimsiz-olarak-evcillestirilmis-olabilir-4420?srsltid=AfmBOorbh-BYmJXeE_dho4Q5Ds7LqLUGP92inuZjtOKygrb0hzhUOAw)
- Kayar, A. (2013). Kan hastalıkları. *İç Hastalıkları Ders Notları*, İstanbul.
- Keskin, E., Durgun, Z., & Kocabatmaz, M. (1994). Some Haematological Parameters, Blood Gases and Plasma Electrolytes Levels in Kangol Dogs. *Veteriner Bilimleri Dergisi*, 10, 1-2, 35-38.
- Klein, A. (2016). Domestic dogs may have evolved separately in Europe and Asia read more. 02.06.2016, <https://www.newscientist.com/article/2091836-domestic-dogs-may-have-evolved-separately-in-europe-and-asia/>
- Martinez, C., Mooney, C.T., Shiel, R.E., Tang, P.K., Mooney, L., & O'Neill, E.J. (2019). Evaluation of red blood cell distribution width in dogs with various illnesses. *Canadian Veterinary Journal*, 60 (9), 964-971.
- Noyan, A. (2007). *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. Palme Yayınevi.
- Ogbu, K., Ezema, K., Adieme, I., Malgwi, R., Sabo, J., Ayuba, P., Ayuba, P., Nguety, S., Atuna, S., Emeribe, F., Shallimzhili, J., Anene, B., & Anene, B. (2021). Determination of hemobiochemical profiles of apparently healthy exotic breed of dogs in jos, plateau state, Nigeria. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 11, 226-245. Doi: 10.4236/ojvm.2021.116015.
- Özdin, M. & Mundan, D. (2018). Hayvan ve insan davranışlarının biyokimyasal, endokrinolojik ve hematolojik parametreler açısından değerlendirilmesi. *Adıyaman Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 4 (3), 1126-1139.
- Özler, A.E. (2023). Kedi ve köpeklerde anemi bulguları gösteren enfeksiyöz ve nonenfeksiyöz hastalıklarda eritrosit morfolojilerine sitopatolojik yaklaşım. *Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aydın, Türkiye*.
- Paksoy, Y. & Arslan, D. (2023). Lama yetiştiriciliğine ilişkin bilgiler ve öneriler. *Antakya Veteriner Bilimleri Dergisi*, 2, 2.
- Paksoy, Y. & Gürle Albayrak, E.Y. (2023). The investigation of the relationship of three different agents causing scabies in cats and dogs with gender, age and some behavioral changes. *Kocatepe Veterinary Journal*, 16 (3), 365-374. Doi: 10.30607/kvj.1294998
- Paksoy, Y. (2024). The horse behaviour towards grooming. *Kocatepe Veterinary Journal*, 17 (1), 22-28. Doi: 10.30607/kvj.1387472
- Paltrinieri, S., Ferrari, R., Scavone, D., Pieroni, C., Diamanti, D., & Tagliasacchi, F. (2024). Increased erythrocyte sedimentation rate in dogs: frequency in routine clinical practice and association with hematological changes. *veterinary clinical studies, Animals*, 14 (10), 1409. Doi: 10.3390/ani14101409.
- Pekmezci, D., & Çolak, Z.N. (2021). Parvovirus ile enfekte köpeklerde nötrofil/lenfosit, monosit/lenfosit ve platelet/lenfosit oranlarının belirlenmesi. *Anadolu Çevre ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi*, 6 (4), 585-591. Doi: 10.35229/jaes.993377
- Savaş, T., & Yurtman, İ.Y. (2008). Hayvan davranış bilimi ve zootekni: tanım ve izlem. *Hayvansal Üretim*, 49 (2), 36-42.
- Sönmez, H.A. (2013). Hastalıkların tanı ve izlenmesinde biyokimya laboratuvarı. *İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, 81.
- Todes, D. (2003). Ivan Pavlov: hayvan makinesini araştırırken. *TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları*, 118.
- Voith, V.L., Wright, J.C., & Danneman, P.J. (1992). Is there a relationship between canine behavior problems and spoiling activities, anthropomorphism, and obedience training? *Applied Animal Behaviour Science*, 34 (3), 263-272. Doi: 10.1016/S0168-1591(05)80121-2
- Wang, X., & Richard, H. (2010). *Dogs: their fossil relatives and evolutionary*



- history. Richard H. Tedford, Mauricio Antón. New York: Columbia University Press., 1, 14.
29. Wingfield-Hayes, R. (2002). China's taste for the exotic. 29.06.2002, http://news.bbc.co.uk/1/hi/programmes/from_our_own_correspondent/2074073.stm
30. Winter, L. (2013). Domesticated dogs most likely originated in Europe nearly 19,000 years ago. 16.11.2013, <https://www.iflscience.com/domesticated-dogs-most-likely-originated-europe-nearly-19000-years-ago-23700>
31. Yıldız, İ. (2001). Kan sayım otomasyon parametreleri. *anemiler*, ed: Soysal T ve Yüksel-Soycan L. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 117-125.
32. Zahorec, R. (2021). Neutrophil-to-lymphocyte ratio, past, present and future perspectives. *Bratislavské Lekárske Listy*, 122 (7), 474-488. Doi: 10.4149/BLL_2021_078





Derleme makalesi / Review article

Veteriner Hekimlikte Homeopatik Viscum Album Kullanımı: Kansere Farklı bir Bakış

Bikem Turanoğlu ^{1a*}, M. Erman Or ^{1b}, Lora Koenhemi ^{1c}¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları ABD, İstanbul, Türkiye

Use Of Homeopathic Viscum Album in Veterinary Medicine: A Different Perspective on Cancer

MAKALE BİLGİSİ:

ARTICLE INFORMATION:

Geliş / Received:

30.05.2024

Revizyon/Revised:

28.07.2024

Kabul / Accepted:

26.08.2024

ORCIDS:

^a 0000-0002-5529-972X^b 0000-0002-8764-1956^c 0000-0002-4979-170X

Abstract:

Homeopathy is a holistic form of treatment developed by the German doctor Samuel Hahnemann. Derived from the Greek words "homois", meaning similar and "pathos", meaning disease, homeopathy is based on the principle of healing like with like. According to the World Health Organization, it is the most commonly used complementary medicine treatment method in the world. Homeopathic treatments have been used in veterinary medicine since the 18th century. In our country, it has started to find a place in veterinary medicine in parallel with the increase in treatment in human medicine in last 10 years. Homeopathic medicines (remedies) are obtained from minerals, plants, animal excreted etc. from nature. Viscum album (mistletoe) is one of the remedy obtained in this way. Many studies have been published on the use of Viscum album extract in cancer patients. The efficacy of homeopathic viscum album on cancer types encountered in veterinary medicine has been reported by in vitro and in vivo studies. The aim of this review is to examine the use and efficacy of homeopathic viscum album in cancer types encountered in veterinary medicine and to provide an alternative perspective to the classical treatment methods used in such cancers.

Keywords: Viscum album, veterinary homeopathy, veterinary oncology

Veteriner Hekimlikte Homeopatik Viscum Album Kullanımı: Kansere Farklı Bir Bakış

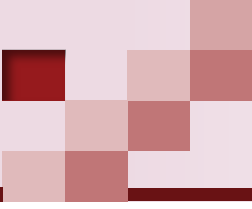
Özet:

Homeopati, Alman Doktor Samuel Hahnemann tarafından geliştirilmiş, bütüncül bir tedavi şeklidir. Yunanca "homois" yani benzer ve "pathos" yani hastalık kelimelerinden türemiş olan homeopati, benzer ile benzeri iyileştirme prensibine dayanır. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre Dünya'da en sık kullanılan tamamlayıcı tıp tedavi yöntemidir. Veteriner hekimliğinde homeopatik tedaviler 18. yüzyıldan beri kullanılmaktadır. Ülkemizde ise, son 10 yıldır beşeri hekimlikteki uygulama artışına paralel olarak veteriner hekimliğinde de yer bulmaya başlamıştır. Homeopatik ilaçlar (remediler) doğadaki mineraller, bitkiler, hayvansal ekskretler vb maddelerden elde edilirler. Viscum album (ökse otu) da bu şekilde elde edilmiş remedilerden biridir. Viscum album ekstresinin kanser hastalarında kullanımı üzerine pek çok çalışma yayınlanmıştır. Homeopatik viscum albumun da veteriner hekimliğinde karşılaşılan kanser türleri üzerine etkinliği, yapılan in vitro ve in vivo çalışmalar ile bildirilmektedir. Bu derlemenin amacı homeopatik viscum albumun, veteriner hekimliğinde karşılaşılan kanser türlerinde kullanımı ve etkinliğini incelemek, bu tür kanserlerde kullanılan klasik tedavi yöntemlerine alternatif bir bakış açısı sunmaktır.

Anahtar kelimeler: Viscum album, veteriner homeopati, veteriner onkoloji

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: bikemturanoğlu@gmail.com, bikem.turanoğlu@ogr.iuc.edu.tr

How to cite this article: Turanoğlu B, Or ME & Koenhemi L (2024). Veteriner Hekimlikte Homeopatik Viscum Album Kullanımı: Kansere Farklı Bir Bakış. *Antakya Vet. Bil. Derg.*, 3(2), 64-68.



Giriş

Homeopati, Alman Doktor Samuel Hahnemann (1755-1843) tarafından geliştirilmiş bir tedavi şeklidir. Homeopatinin temel kuramı "Benzeri benzer ile tedavi etme-Similia similibus curentur" dir. Benzerlik kuramına göre, sağlıklı insanda belli semptomlara sebep olan bir madde aynı semptomları gösteren hastaya verildiğinde hastayı tedavi eder. Hahnemann bu yaklaşımı benimseyerek ve proving olarak adlandırılan deneylerle kanıtlayarak bütüncül bir tedavi sistemi ortaya koymuştur. Bu tedavi materyallerine "remedi" adını vermiştir (Vithoulkas, 2018).

Homeopatik remediler pek çok bitkisel, hayvansal ve mineral bileşikleri içerebilmektedirler. Remediler, tablet, krem, pellet, toz, sıvı gibi pek çok formda hazırlanırlar (Yaramış ve ark., 2016). Bu formlara seyreltme, karıştırma, ezme ve çalkalama gibi bir dizi işlemle geçerek ulaşırlar. Homeopatide seyreltme, ana maddenin toksisite ve yan etkilerini azaltmakta; karıştırma, ezme ve çalkalama işlemleri ana maddenin iyileştirme etkilerini arttırmaktadır. Bu sayede zehirli ve zararlı maddeler etkisiz hale getirilmekte ve uygun dozlar seçilerek etkili bir tedavi yapılabilmektedir (Pekmezci ve Gültiken, 2015). Bu seyreltme ve çalkalama işlemine ise "potentizasyon" adı verilir. Potentize edilmiş dozlar D, C, M, LM gibi dilüsyon miktarlarına göre adlandırılırlar. Homeopatik remedilerin etkileri ise deneyleri (provingleri) sonucu ortaya çıkmakta, bunlar ayrı ayrı açıklanmakta ve materia medica denen kitaplarda tek tek yer almaktadır (Kurtsan, 2019). Homeopatik remedilerin kullanımı son derece güvenlidir. Herhangi bir yan etkisi olmayan bu ürünlerin, bu konuda bilgi sahibi olan kişiler tarafından kullanılması tedavide başarı şansını arttırmaktadır (Yaramış ve ark., 2016).

Veteriner Hekimlikte Homeopati

Homeopati, hem büyük hem de küçük hayvan pratiğinde uzun yıllardan beri güvenle uygulanmaktadır. Travmalar, akut yaralanmalar, diyare, kronik gingivitis gibi akut ve kronik pek çok tipte inflamasyon ile böbrek yetersizliği, akut ve kronik solunum rahatsızlıkları, davranış bozuklukları gibi durumlarda kullanılmaktadır (Yaramış ve ark., 2016). Ülkemizde at, sığır, koyun, keçi ve köpeklerde kullanılan Theranekron (Tarentula cubensis D6) adlı homeopatik preparat ayak ve tırnak hastalıkları, apseler, nekrotik, proliferatif durumlar ile kanser olgularında kullanılmaktadır (Gönül ve ark., 2015). Hastadan sorumlu bireylerden alınan ayrıntılı anamnez bilgileri sonucunda doğru homeopatik ilaç seçimi veteriner hekim tarafından yapılmaktadır. Bu seçimin doğruluğu ve uygunluğu hekimin homeopati eğitimi ile fizyopatoloji bilgisine bağlı Turanoğlu et al., (2024)

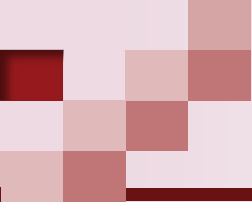
olmaktadır (Parkan Yaramış, 2024)

Homeopatik Viscum Album'un Veteriner Hekimlikte Kullanımı ve Vaka Örnekleri

Viscum album diğer adıyla ökse otu, ağırlıklı olarak Avrupa kıtasında yetişen, birçok konakçı ağaçta görülebilen semi-parazitik otsu bir bitkidir. Özellikle Avrupa'da Kelt kültüründe sıklıkla hastalıkları iyileştirmek için kullanılan bu ot, orta çağdan 19 yüz yıl'a kadar pek çok tıbbi alanda kullanılmıştır (Valle ve Carvalho, 2020). Artvin bölgesi'nden toplanan, kurutulmuş ve ekstrakte edilen Viscum album ile yapılan bir çalışmada bitkinin antidiyabetik, antioksidan ve antimikrobiyel etkinliği gösterilmiştir (Köseoğlu ve ark., 2020). Viscum album ekstraktı köpeklerde intravenöz olarak uygulandığında kardiyovasküler etkileri ve hipotansif aktivitesi olduğu bildirilmiştir (Bowman, 1990). Bitkinin diğer terapötik etkileri ise antikanser, immunomodülatör, hepatoprotektif ve antifungal özellikleridir (Valle ve Carvalho, 2020).

Hem atlar hem de kediler üzerinde Viscum album ekstraktı ile iki farklı plasebo karşılaştırmalı çalışma yapılmıştır. Bunların ilkinde sarkoid tümör tespit edilmiş atlara Viscum album ekstraktı parenteral yolla verilerek 12 ay sonunda tüm gruplar hem tedavi hem de tümör gelişimi açısından incelenmiştir. Sonuç olarak plasebo grubunun sadece %14 ünde semptomlarda gelişim görülürken, Viscum album kullanılan grubun %41'inde gelişim kaydedilmiştir (Klocke ve ark.,2008). İkinci araştırmada yüksek nüks kapasitesine sahip, eksize edilmiş fibrosarkomları olan kedilere operasyon sonrası nüksü engellemek için oral yolla Viscum album ekstraktı verilmiştir. Bu kediler sadece operasyon olmuş, kemoterapi veya radyoterapi uygulanmış ya da bunları kombine olarak almış kediler ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, Viscum album kullanılan grupta sağ kalım sürelerinin uzun olduğu ve hastaların yaşam kalitesinin olumlu etkilendiği gösterilmiştir (Klocke ve ark., 2008).

Viscum album ekstraktının antidiyabetik etkinliğini metformin ile karşılaştırmak için yapılan çalışmada ise Alloxan ile indüklenen ratlarda diabet oluşturulmuş ve bir grup rata metformin bir gruba da Viscum album ekstresi verilmiştir. Viscum album verilen grupta, kolesterol, trigliserid ve LDL de ciddi düşüş, HDL de ise ciddi yükseliş görülmüştür. Ayrıca AST, ALT aktivitelerinde de ciddi düşüş gözlemlenmiştir. Plasebo grubunda ise diyabete bağlı kilo kaybı olurken, metformin grubu ile karşılaştırıldığında ise yüksek antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Bello ve ark.,2019).



Viscum album ekstraktının köpeklerde meme tümörü tedavisinde adjuvan tedavi olarak kullanılabileceğine dair etkinliğini gösteren çalışma sunulmuştur (Valle ve Carvalho, 2020).

Homeopatik Viscum album ile yapılan çalışmalardan biri olan bu çalışmada, osteosarkom hücreleri ultradilüe Viscum album (VA), VA D3 ve VA D30 potensindeki iki farklı dozun varlığında kültüre edilmiş ve hücre canlılığı 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolyum bromür (MTT) sitotoksik testi ile değerlendirilmiştir. VA D3 ve VA D30 ilave edilen hücre kültürleri ile kontrol grubu 48 saat inkübe edilmiş, 48 saat sonunda MTT kolorimetrik testi uygulanmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Sonucunda, düşük konsantrasyonlu homeopatik VA D3 ve VA D30 ile osteosarkom hücre popülasyonunun %50'sini azaltmanın mümkün olduğu gösterilmiştir (Valle ve ark., 2020).

Homeopatik Viscum album ve antropozofik Viscum album preparatlarının anti-tümöral aktivitesini in-vitro olarak karşılaştırmak amacıyla yapılan çalışmada, her iki preparatın da benzer sitotoksik aktivite sahip olduğu fakat Viscum album ekstresinin hücrelere %25 oranında daha düşük bağlanma kapasitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle homeopatik Viscum albumun etkinliğinin daha üstün olduğu bildirilmiştir (Batista ve ark., 2015).

Kanin mezenşimal kök hücrelerinde homeopatik D1D2 potensindeki Viscum albumun (VA D1D2) sitotoksik özelliğini kanıtlamak adına yapılan bir çalışmada, homeopatik Viscum albumun anti-tümör aktivitesi ve selüler sitotoksik testi edilmiştir. Çalışmada, kanin mezenşimal hücreleri ile VA D1D2'nin aralarındaki etkileşim de değerlendirilmiştir. 10 mL/mL konsantrasyondaki VA ile kontrol grubundaki hücreler karşılaştırıldığında hücre sayısının korunduğu görülmüştür. Fakat VA konsantrasyonu arttıkça hücre canlılığında önemli ve kademeli bir azalma kaydedilmiştir. 20 mL/mL konsantrasyondaki VA ile yapılan kontrol grubu karşılaştırmalı apoptoz analizi sonucunda ise bir önceki gruptan daha yüksek (10 mL/mL grubu) apoptoz oranları kaydedilmiştir. Sonuç olarak, VA'un etkinliğini görmek için etkili bir yol olan in-vitro sitotoksik testi ölçümü, bileşiğin bu konsantrasyonlardaki etkinliğini göstermiştir (Valle ve ark., 2022-a).

D3 ve 200 CH potensindeki homeopatik Viscum albumun in vitro sitokin modülatör etkisini göstermek amacıyla mezenşimal kök hücre üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Mezenşimal hücreler tarafından üretilen TNF- α , IFN-g, IL-6, IL-

1 β pro-inflamatuar sitokin seviyeleri, 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda ölçülmüş, TNF- α ile IFN-g seviyelerinde önemli bir değişiklik olmazken, IL-6 ve IL-1 β seviyelerinin düşmüş olduğu tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda VA D3 ve VA 200 CH'nin anti-inflamatuar ve immunmodülatör olarak önemli rol oynayabileceği düşünülmüştür (Valle ve ark., 2022-b).

Viscum albumun farklı potensleri ile glioma tümör hücrelerinde (KNS-42) yapılan bir başka in vitro çalışmada, Viscum album D3, D6, D9, D12 ve D30 potenslerinin 50 mL/mL konsantrasyonlarda sitotoksik aktiviteleri araştırılmıştır. VA D3, VA D6 ve VA D9 un glioma hücrelerinde daha yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği, potens arttıkça düşük sitotoksik aktivitesi olmasına rağmen immunmodülatör etkinin arttığı ve doğal öldürücü (natural killer) hücreler üzerine etki gösterdiği bildirilmiştir. Sonuç olarak, VA'un D3, D6, D9, D12 ve D30 potenslerinin glioma hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir (Valle ve ark., 2023).

12 yaşlı, pulmoner ve şipenik metastazı bulunan kolanjiyokarsinomlu bir köpeğin tedavisinde VA D3, VA D6, VA D9, VA D12, VA D30 potensleri 30 gün boyunca parenteral yolla uygulanmıştır. Bu tedaviyle beraber kromoterapi, othemoterapi, Taraxacum officinale D10, Fosfor D60, Carcinosinum D400 homeopatik remedilerini içeren bir kompleks ile D3 vitamini, omega-3, curcumin, piperin, momordica charantia da kullanmıştır. Sonuç olarak bu protokol tam remisyona sonuflanmamış fakat hastanın sağ kalım süresi 11 aya uzamıştır (prognoz 2-6 ay). Bu süre zarfında tümör büyüme hızında yavaşlama ve yaşam kalitesinde artma kaydedilmiştir. Ayrıca hastanın ağrı ve rahatsızlık yönünden herhangi bir belirti göstermediği bildirilmiştir (Valle ve ark., 2019-a).

Transmisibl veneral tümörü (TVT) olan 2 yaşlı, miks ırklı bir dişi köpekte yapılan bir vaka takdiminde ise tedavide oral ve topikal olarak Thuja occidentalis (Thuj) remedisi ile VA D3, D6, D9, D12 ve D30 remedileri bir protokol dahilinde kullanılmıştır. 2. Aydan itibaren Viscum album tedavisi hergün değil farklı günlerde uygulanmaya başlanmıştır. 150 günün sonunda tümör %90 oranında gerilemiş ve kanlı vajinal akıntı son bulmuştur. Son olarak tek doz vincristin tümör remisyonunu önlemek için uygulanmıştır. 1 hafta sonraki kontrolde tümöre ait herhangi bir kitleye rastlanmamıştır. Tedavi boyunca herhangi bir yan etki ile karşılaşılması (Valle ve ark., 2019-b).

Oral papillomatozis saptanan iki vakadan ilkinde; Oral



papillomatozis saptanan 3 yaşlı dişi Pug ırkı köpekte Thuj 6 CH oral yolla, Thuj D9 ile VA D3 parenteral yolla haftada 2 defa uygulanmıştır. İkinci papillom ise 3 yaşlı dişi İngiliz Bulldog köpekte saptanmıştır. Bu köpeğe de aynı tedavi uygulanmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır. Pug ırkı köpekte ilk olarak cerrahi yolla alınan papillom 3 ay sonra tekrarlanmış ve homeopatik tedavi protokolü başlanmıştır. İlk hafta herhangi bir gelişme görülmemiş fakat nüks de görülmemiştir. Bulldog ırkı köpekte ise tedaviye başlanılan ilk haftadan itibaren iyileşme görülmüş ve nüks kaydedilmemiştir. 15 gün içerisinde papillomların tedavi olduğu ve nüks olmadığı bildirilmiştir (Valle, 2020).

Hepatoselüler karsinomlu bir köpeğe VA D3, D6, D9, D12, D30 potensleri parenteral yolla uygulanmıştır. Ayrıca oral olarak tedaviye vitaminler, antioksidanlar ve fosfor 30 CH + Taraxacum 30 CH remedileri ilave edilmiştir. Sonuç olarak, tümörün büyümesi tedavi uygulandığı sürece kontrol altına alınmış ve hastanın sağlık durumu stabil seyretmiştir. Tedaviyi uygulama sıklığı azaldıkça tümörün büyüme hızı artmış ve genel sağlık durumu olumsuz ilerlemiştir. Hasta 24 ay sağ kalım süresine erişmiştir. Viscum album ile tedavi sürdürdüğü süre boyunca, hastanın yaşam kalitesi iyi yönde gelişmiş, tümör büyüme hızı kontrol altına alınmış ve sağ kalım süresi uzamıştır (Valle ve Carvalho, 2021-a).

4 yaşlı, erkek, FIV FeLV pozitif ve dilinin sağ ventral kısmında kitle olan lenfomalı bir kedide VA D3, D6, D9, D12, D30 potensleri parenteral yolla 60 gün uygulanmıştır. İlaveten Arnica D4, Apis D4 ve Mercury D18 remedileri parenteral olarak 20 gün kullanılmıştır. Sonuçta, hastada FIV ve FeLV'nin konvansiyonel tedavisinden beklenilenin üç katı sağ kalım süresi kaydedilmiştir. Viscum albumun lenfoma tedavisinde yan etkiye neden olmadığı, yaşam kalitesini arttırdığı ve sağ kalım süresini uzattığı belirtilmiştir (Valle ve Carvalho, 2021-b).

İkinci derece yumuşak doku sarkomu olan 12 yaşlı, dişi köpeğin tedavisinde D2, D3, D6, D9 ve D30 potenslerinde homeopatik VA parenteral yolla kullanılmıştır. Ayrıca doğal diyet ve akupunktur da yardımcı terapiler olarak kullanılmıştır. Şubat 2017 ve Ağustos 2020 arasında tümör kitlesi yavaş yavaş büyüyerek bir hacme ulaşmış ve ruptur tehlikesi nedeniyle alınmıştır. Sonrasında aynı tedaviye, yaşam kalitesini koruduğu ve metastazı engellediği için devam edilmiştir. Hasta toplamda 58 ay yaşamını sürdürmüştür. Bu süre operasyon sonrası radyoterapi ile karşılaştırıldığında (1-3 yıl) üstün bulunmuştur. Homeopatik VA'un kombine dozlarda kullanımının hastanın yaşam süresi olan 58 ay boyunca sarkomun evrenmesi, kontrolü, bağışıklığının artırması, yaşam kalitesinin Turanoğlu et al., (2024)

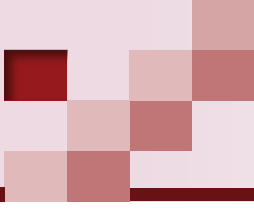
iyileştirilmesi ile klinik ve laboratuvar parametreleri üzerine olumlu etki etmiştir (Lopes ve ark., 2022).

Melanoma, Dünya'da köpekler arasında en sık görülen kanserlerden biridir. Kutanöz melanoma yönetimi zor ve düşük sağ kalım oranına sahip bir kanser türüdür. Melanositik melanoma saptanmış 10 yaşlı erkek köpekte ve VA D3, D6, D9, D12 ve D30 potensleri kombine olarak kullanılmıştır. 4 haftalık tedavi sonunda yarada gözle görülür gerileme saptanmıştır. Ayda bir takip edilen hasta 6 ayın sonunda iyi kondisyonda ve aynı seviyede kalmıştır (Valle ve Carvalho, 2021-c).

Mezoteliom köpeklerde nadir rastlanan, agresif ve yüksek mortalite ile seyreden bir kanser türüdür. Mezoteliom teşhisi almış 3 yaşlı, erkek köpekte VA D3, D6, D9, D12 ve D30 potensleri kombine olarak uygulanmıştır. Sonuçta, tedavi kistik yapıların modifikasyonunu destekleyerek 30 ay boyunca abdominal kitlenin metastaz yapmasını engellemiş, ağrı ve rahatsızlığa dair herhangi bir semptom gözlenmemiştir. Hastanın yaşam kalitesi yükselmiş ve sağ kalım süresi uzamıştır (Lopes ve ark., 2021).

Squamöz hücreli karsinom teşhisi almış 9 yaşlı, dişi köpek konvansiyonel tedavi almış fakat tedavi başarılı olmamıştır. Homeopatik tedavi için VA D3 intravenöz yolla ve Hamamelis virginia remedisi oral yolla 60 gün kullanılmıştır. Tedavi başladıktan 7 gün sonraki kontrolde lezyonların olumlu yönde iyileştiği gözlemlenmiştir. 4 haftada derideki squamöz hücreli karsinom görünümü değişmiş, hasta eskisine göre daha iyi olmuştur. Lezyonlar iyileştikten sonra hasta yakını tedaviyi durdurmuş ve hasta konvansiyonel tedavilerin uygulandığı başka bir klinikten takip edilmiştir. 6 ay sonra arka bacağa osteosarkom teşhisi konmuştur ve hasta 30 gün sonra ötanazi edilmiştir. Sonuç olarak, 1 ay sonunda lezyonlarda iyileşme ve osteosarkom teşhisine kadar 6 ay sağ kalım süresi gözlemlenmiştir (Valle ve Carvalho 2021-d).

Sonuç olarak, veteriner hekimliğinde homeopatik Viscum albumun birçok kanser türünde kullanımı yan etki insidansının olmaması, kombine tedavilere uyum kolaylığı, sağ kalım süresini uzatması ve yaşam kalitesini arttırması gibi nedenlerinden dolayı tercih edilmektedir. Önümüzdeki süreçte, ülkemizde de gelişen veteriner homeopati pratiği ile bu homeopatik preparatların kullanımının yaygınlaşacağını düşünmekteyiz.



Etik Beyan: Bu derlemede Etik kurul iznine gerek yoktur. Bu konuda sorumluluk yazar/yazarlara aittir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Kaynaklar

1. Batista, J.V.C., Melo, M.N.O., Oliveira, A.P., Viriato, E.P., Baumgartner, S., Holandino, C. (2015). Antitumoral activity of homeopathic and anthroposophic viscum album's preparations: an in vitro assay. *International Journal of High Dilution Research* 14 (2):53-54. Doi: 10.51910/ijhdr.v14i2.788
2. Bello MI, Wali WE. (2019). Antidiabetic Activity of *Viscum album* (Guava Mistletoe) in Alloxan-induzida por Diabetic Rats. *International Journal of Science and Research; Vol 8 Issue (4): 207-214.* Doi: 10.21275/8021901
3. Bowman, I.A. (1990). The Everlasting Mistletoe and the Cardiovascular System. *Tex heart Inst. J.* 17 (4): 310-314.
4. Gönül, R., Koenhemi, L., Aydın, H., Gülyaşar, T., Demircan Yardibi, H., Or, E., Hoştürk, G., Uysal, A., Barutçu, B. (2015). Effects of *Tarantula cubensis* Extract on Electrocardiographic and Tracce Element Status in Sheep. *J.Fac. Vet.Med. Istanbul Univ.,* 41 (1), 79-83. Doi: 10.16988/iuvfd.2015.25554
5. Klocke P., Biegel U., Clottu O., Ramos M., Gerber V., Ruess-Melzer K. (2008). Using *Viscum album* Extracts (ISCADOR) for Successful Management of Neoplasms of the Skin in Horses and Cats in Consideration of Aspects Relevant to Human Medicine. *European Journal of Integrative Medicine* 1 (Suppl.), p.48.
6. Köseoğlu, D., Yiğit, F.G., Tuncay, G., Özcan, K. (2020). *Viscum Album* (Ökse Otu) ekstralarının Antimikrobiyal, Antioksidan ve Antidiyabetik Etkilerinin Belirlenmesi. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi,* 10(2), 380-394. Doi: 10.31466/kfbd.808898
7. Kurtsan, M. (2019). Türkiye'de Homeopatinin Uygulanabilmesi için Yapılması Gerekenlerin Belirlenmesi. Yüksek Lisans (Tez), İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye
8. Lopes, D.F., Andreta, A.C.B., Traldi, R.F. (2022). Integrative Clinical Treatment of Grade II Soft Tissue Sarcoma with Homeopathic Mistletoe and Associations: Case Report. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 10 55-61. Doi: 10.17265/2328-2150/2022.02.004
9. Lopes, D.F., Barbosa, G.A., Marques, H.B. (2021). An Unconventional Approach in the Treatment of Canine Peritoneal Mesothelioma with Ultra-diluted *Viscum album*: Case Report. *International Journal of Homeopathic Sciences* 5(3); 329-333. Doi: 10.33545/26164485.2021.v5.i3e.444
10. Parkan Yaramış Ç. (2024). Otoimmun Hastalıklarda Homeopati. *Kedi ve Köpeklerde Otoimmun Hastalıklar. Türkiye Klinikleri Veteriner Bilimleri İç Hastalıkları Özel Konular;* p.86-90
11. Pekmezci, D., Gültiken, N. (2015). Homeopatinin prensipleri ve Veteriner Hekimlikte Kullanımı. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 12(1) 49-56.
12. Valle, A.C.V. (2020). Homeopathic Treatment of Oral Papillomatosis in Dogs (*canis familiaris*)-Case report. *International Journal of Science and Research.* Doi: 10.212275/SR21907103139
13. Valle, A.C.V., Aguiar, L.R., Brunel, H.S.S., Malard, P.F., Andrade, R.V. (2020). Homeopathic viscum album extract inhibits the growth of osteosarcoma cells. *Journal of Integrated Standardized Homeopathy, Vol 3, Issue 2. April-June.* Doi: 10.25259/JISH_32_2020
14. Valle, A.C.V., Brunel, H.S., Dallago, B.S.L., Rodrigues, L.S., Malard, P.F., Costa, R.A., Rossetto, R., Andrade, R.V. (2022-a). In-vitro Growth Kinetics of Mesenchymal Stem Cells in Cytotoxicity Tests Using Low-diluted *Viscum album*. *Homeopathy* 2023; 112(01): 040-049. Doi: 10.1055/s-0042-1747682
15. Valle, A.C.V., Brunel, H.S.S., Araujo, A.R.B., Carvalho, A.C. (2023). In vitro Cytotoxic activity of different viscum album potencies in glioma cells. *International Journal of Health & Medical Research, Volume 2 Issue 01 p.04-06.* ISSN:2833-2148.
16. Valle, A.C.V., Brunel, H.S.S., Malard, P.F., Villarroel, C.L., Andrade, R.V. (2022-b). Homeopathic viscum album at potencies D3 and 200 CH presents cytokine modulatory effect produced by in vitro culture of mesenchymal stem cells. *Current Research in Complementary & Alternative Medicine Vol 06, Issue 02.* Doi: 10.29011/2577-2201.100055
17. Valle, A.C.V., Carvalho, A.C. (2020). *Viscum album* in Veterinary Medicine. *International Journal of Science and Research. Volume 10 Issue 8.* Doi: 10.21275/SR2172105153
18. Valle, A.C.V., Carvalho, A.C. (2021-a). Long Term Survival of a Patient with Hepatocellular Carcinoma Under Treatment with *Viscum Album*-Case report. *Medical Research Archives, online* 11(7). Doi: 10.18103/mra.v11i7.2.4090
19. Valle, A.C.V., Carvalho, A.C. (2021-b). *Viscum Album* Therapy for Treating Lymphoma in an FIV and FeLV Positive Cat (*Felis Catus*)-Case report. *Integrative Journal of Veterinary Biosciences Volume 5 Issue 2.* Doi: 10.31038/IJVB.2021524
20. Valle, A.C.V., Carvalho, A.C. (2021-c). Ultra-diluted *Viscum Album* in the Treatment of Cutaneous Melanoma a Dog (*canis familiaris*)-Case Report. *Indian Journal of Research, volume 10, Issue 04.* Doi: 10.36106/paripex
21. Valle, A.C.V., Carvalho, A.C. (2021-d). Homeopathic *Viscum album* on the Treatment of Squamous Cell Carcinoma Lesion in a Dog (*canis familiaris*)-Case Report. *Integrative Journal of Veterinary Biosciences, volume 5 Issue 2.* Doi: 10.31038/IJVB.2021523
22. Valle, A.C.V., Lima, L., Bonamin, L., Brunel, H., Barros, A., Carvalho, A., Andrade, R.V. (2019-a). Use of *Viscum album* in the Integrative Treatment of Cholangiocarcinoma in a Dog (*canis familiaris*)-Case report. *Adv Complement Alt Med.* (5) 4.
23. Valle, A.C.V., Sibata, M., Andrade, R.V., Carvalho, A. (2019-b). Homeopathy for the treatment of transmissible venereal tumor (TVT) in a mix-breed female dog. *Advances in Complementary & Alternative Medicine Vol 5 Issue 4.* Doi: 1031031/ACAM.2020.05.000619
24. Vithoulkas, G. (2018). Homeopatinin Temel İlkeleri. *Günçe Yayınevi.*
25. Yaramış, Ç., Issautier, M., Ulgen Saka, S., Demirtaş, B., Olgun Erdikmen, D., Or, E. (2016). Homeopathic Treatments in 17 Horses with Stereotypic Behaviours. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 22 (5): 793-799. Doi: 10.9775/kvfd.2016.15418