



VAN VETERINARY JOURNAL

April 2016 • Volume 27 (1) • 1-52

ISSN : 2149-3359
E-ISSN : 2149-8644





April - 2016

VAN VETERINARY JOURNAL



This journal previously published as: **Yuzuncu Yil Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**

ISSN: 2149-3359

E-ISSN: 2149-8644

Owner

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Dean)

Editor-in Chief

Prof. Dr. Nihat MERT
YYU, Veteriner Fak., Dergi Editorlugu
Kampus / Van - Turkey
Tel: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 (432) 225 11 27
e-mail: vfd@yyu.edu.tr

Editorial Board

Prof. Dr. Zafer SOYGUDER (Language Editor)
Prof. Dr. Ebubekir CEYLAN (Editor)
Prof. Dr. Handan MERT (Proof & Quality Editor)
Assoc. Prof. Dr. Ozgur ISLEYICI (Technical Editor)
Assoc. Prof. Dr. Ismail Hakki EKIN (Electronic Journal Editor)
Assoc. Prof. Dr. Abdullah YESILOVA (Statistical Editor)
Assist. Prof. Dr. Bahat COMBA (Editor)

Publication Board

Prof. Dr. Abuzer TAS (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Ali CINAR (Univ. of Ataturk)
Prof. Dr. Askarbek TULEBAEV (Manas, KYRGYZSTAN)
Prof. Dr. Axel WEHREND (Giessen, GERMANY)
Prof. Dr. Berrin SALMANOGLU (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Ehab Abu-Basha (Irbid, JORDAN)
Prof. Dr. Gert W NIEBAUER (Vienna, Austria)
Prof. Dr. Gursel SONMEZ (Univ. of Uludag)
Prof. Dr. Handan MERT (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Hasan Altan AKKAN (Univ. of Mehmet Akif Ersoy)
Prof. Dr. Hasan Huseyin HADIMLI (Univ. of Selcuk)
Prof. Dr. James M.MAY (Nashville, TN, USA)
Prof. Dr. Kamil EKICI (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Kemal Ozdem OZTABAK (Univ. of Istanbul)

Prof. Dr. Mehmet Akif KARSLI (Univ. of Kirkkale)
Prof. Dr. Taylan AKSU (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Tevhide SEL (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Volkan AKYOL (Univ. of Uludag)
Assoc. Prof. Dr. Baris Atalay USLU (Univ. Of Cumhuriyet)
Assoc. Prof. Dr. Devrim S. AKSU (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Hasan Huseyin ARI (Univ. of Cumhuriyet)
Assoc. Prof. Dr. Nalan OZDAL (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Tugba BINGOL (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Bahattin CAK (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Zeynep KARAPINAR (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Selim CINAROGLU (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Yildiray BASBUGAN (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Kivanc IRAK (Univ. of Siirt)
Dr. Josip LOVRIC (Manchester, ENGLAND)

Scientific Board of This Issue

Prof. Dr. Ali Rıza Aksoy (Univ. of Kafkas)
Assoc. Prof. Dr. Devrim Sarıpinar Aksu (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Ali Aydın (Univ. of Istanbul)
Prof. Dr. Ayşegül Bildik (Univ. of Adnan Menderes)
Assoc. Prof. Dr. N. Tuğba Bingöl (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Ayşe Ebru Borum (Univ. of Balıkesir)
Assist. Prof. Dr. Bahattin Çak (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Selim Çınaroğlu (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Armağan Çolak (Univ. of Ataturk)
Prof. Dr. Hasan Hüseyin Dönmez (Univ. of Selcuk)

Assoc. Prof. Dr. İsmail Hakkı Ekin (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assoc. Prof. Dr. Ecevit Eydurhan (Univ. of Iğdir)
Assoc. Prof. Dr. Özgür İşleyici (Univ. of Yuzuncu Yil)
Assist. Prof. Dr. Mikail Kara (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Nihat Mert (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Yakup Can Sancak (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. Ufuk Tansel Şireli (Univ. of Ankara)
Prof. Dr. Abuzer Taş (Univ. of Yuzuncu Yil)
Prof. Dr. İbrahim Taşal (Univ. of Mehmet Akif)
Assist. Prof. Dr. Serkan Yıldırım (Univ. of Ataturk)
Prof. Dr. Mecit Yörük (Univ. of Yuzuncu Yil)

This journal is published three times a year

All articles in this journal are available free of charge from <http://vfdergi.yyu.edu.tr>

Published by Onder Ofset, Van, Türkiye

Year	Volume	Issue
2016	27	1

This journal indexed / abstracted in EBSCOhost, CAB Abstracts, DOAJ, Index Copernicus, TUBITAK-ULAKBIM, Türkiye Atif Dizini and Google Scholar





Survival Rates of Lambs, Greasy Fleece Weight and Live Weight at Parturition of Fat-Tailed Hamdani Sheep Grown in East Anatolia Region of Turkey

Erdal BINGOL¹ Mehmet BINGOL²

¹Hakkari University, Colemerik Vocational School, Department of Veterinary Sciences, Hakkari, Turkey

²Yuzuncu Yil University, Faculty of Agriculture, Department of Zootechnics, Van, Turkey

Received: 04.06.2015

Accepted: 07.10.2015

SUMMARY

This research has been carried out to determine the survival rates of lambs, greasy fleece weight and live weight at parturition of fat-tailed 125 Hamdani ewes under extensive village conditions in Çığıllı village of Çukurca province in Hakkari, Turkey. The survival rates (SRs) for lambs were found to be 98.5%, 96.2%, 96.2%, 94.6%, 93.9%, 93.9%, 93.9%, 99.2% and 99.2% for from birth (SR1), from birth to 1th (SR2), from birth to 2th (SR3), from birth to 3th (at weaning) (SR4), from birth to 4th (SR5), from birth to 5th (SR6), from birth to 6th (SR7), from 3th to 5th month (SR8) and from 3th to 6th month (SR9), respectively. The adjusted values related to average greasy fleece weight (GFW) and average live weights at parturition (LWP) of Hamdani ewes were found to be 2.29 ± 0.13 kg and 71.57 ± 1.28 kg, respectively. Significant effect of age and birth type on LWP of ewes were found (P<0.05). As a result, it was determined that SRs of lambs, average GFW and average LWP of Hamdani ewes with this study. Hamdani sheep had a better performance for mentioned traits compared with Turkish native sheep breeds and some certain cross breeds developed recently known in Turkey.

Key Words: Greasy fleece, Hamdani ewes, Lamb, Parturition weight

ÖZET

Doğu Anadolu'da Yetiştirilen Hamdani Koyunlarında Kirli Yapağı Verimi, Doğum Zamanı Canlı Ağırlık ve Kuzularda Yaşama Gücü Özellikleri

Bu çalışma, Hakkari ili Çukurca ilçesi Çığıllı bölgesinde ekstansif köylü koşullarda yetiştirilen 125 baş Hamdani koyununun doğumdaki canlı ağırlık özellikleri, kirli yapağı verimleri ve kuzularda yaşama gücü özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Kuzularda, doğumda (SR1), doğum-30. gün (SR2), doğum-60. gün (SR3), doğum-sütten kesim (90. gün) (SR4), doğum-120. gün (SR5), doğum-150. gün (SR6), doğum-180. gün (SR7), sütten kesim-150. gün (SR8) ve sütten kesim-180. gün (SR9) yaşama gücü oranları (SRs) sırasıyla %98.5, %96.2, %96.2, %94.6, %93.9, %93.9, %93.9, %99.2 ve %99.2 olarak hesaplanmıştır. Ortalama kirli yapağı verimi (GFW) ve doğumdaki canlı ağırlık (LWP) sırasıyla 2.29 ± 0.13 ve 71.57 ± 1.28 kg olarak bulunmuştur. Doğum dönemi canlı ağırlık değerleri üzerine koyun yaşı ve doğurma tipi faktörlerinin etkilerinin önemli (P<0.05) olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada Hamdani koyunların GFW ve LWP verimleri ile kuzularda yaşama gücü değerleri tanımlanmıştır. Hamdani koyunlarının gerek yerli ve gerekse bazı melez koyun ırklarıyla karşılaştırılabilir özelliklere sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Kirli yapağı, Hamdani koyun, Kuzu, Doğum ağırlığı

INTRODUCTION

Sheep production has retained its importance for centuries in agriculture and the economy as well, besides its role in human nutrition in Turkey. It is well-known that Turkey has a rich domestic animal population but has low animal productivity. This is mainly due to the high number of the native breeds having low productivity and traditional extensive production methods. Although developments have been observed in sheep breeding structure, the traditional extensive production method is still a common practice for the breeders. Ninety-four per cent of the sheep

population is of native breeds whereas only 6% is pure Merino and its crosses (TÜİK 2014).

Protection of genetic resources of indigenous breeds is important for the future creation of new types and necessary genetic material for the concerns that may arise in the future as a result of environmental conditions throughout the World. In addition, examination and evaluation of the infrastructure of the traditional sheep breeding are important for breeding programs (Kaymakçı 2006).

From this point of view, it is inevitable to identify and

conserve our native genetic resources such as fat tailed Hamdani sheep. Hamdani sheep geographically are grown in a wide area including Iran, northern Iraq and Turkey's South East regions. Hamdani sheep, also known as "Karadi", are reported to be of Iraqi origin and highly preferred by domestic sheep-raisers. (Aziz and Al-Oramary 2005). It is believed that this breed was brought to the Hakkari and Şırnak provinces from Northern Iraq, 200 - 250 years ago. Hamdani sheep reared in Hakkari, Van, Siirt, Şırnak, Batman, Bitlis provinces located in the Eastern and South Eastern Anatolia regions of Turkey are preferred and demanded by sheep farmers. Therefore, according to market data they are still preferable although the price of their meat is nearly 10% - 20% higher in comparison with other breeds in Turkey (Örkiz et al. 1984). Hamdani sheep are maintained in their sheds through the cold season following lambing in February-March when all of them feed mainly on straw for feeding. The flocks are taken out to graze on pastures and stubble in the rest of the year. Milking once a day was started one month after the weaning. 3 to 4 months after the weaning the ewes were milked twice a day for two months and then once a day in the following months. Sheep are housed in simple and generally unhygienic sheep-sheds during the winter and they are generally fed on straw. The grazing period is about from 6 to 7 months. In meat, milk and wool production, Hamdani sheep is a breed that has a good adaptability to the local agro-ecological conditions (Magid et al. 2003; Alkass and Juma 2005). Hamdani sheep produce, on average, 78.3 kg of milk per lactation (Raaof 2005) and 2.1 kg of coarse wool per year (Al-Barzinji 2009). Generally, wool cutting time is between June and August in the Hakkari region. The fat-tailed Hamdani sheep are known for their white body with a black head and black neck, high-legs and long-ears. The rams and ewes are generally hornless. They can easily be distinguished with this feature from other native breeds and varieties of sheep grown in the region (Öztürk 1998). They have fat tail composed of three parts they have coarse mixed wool. The wool of Hamdani sheep is preferred carpet, pillow and mattress making in the Hakkari region (Aziz 1993).

The structural measures of traditional extensive production systems should be well defined from the standpoint of the nature condition, cultural structure, native breed characteristics, management methods and traditional cooperation among all regions of Turkey.

This research was carried out to determine the survival rates of lambs, greasy fleece weight and live weight at parturition of Hamdani ewes grown under extensive village condition.

MATERIALS and METHODS

In the study, 125 head Hamdani ewes (2 to 4 years old) grown under extensive village conditions in Çıgılı village, Hakkari, Turkey were provided for evaluating quantitative traits viz. the survival rates (SRs) of lambs, greasy fleece weight (GFW) and live weight at parturition (LWP), respectively. The ewes had lambed from mid-December to February and they were kept under similar conditions. For all the ewes and lambs, routine vaccination and parasite treatment were provided. In winter, they were put in a barn with an outdoor lot, and fed hay, straw and a small amount of concentrate feed. In grazing season, animals were only grazed. The study was conducted over a total of 122 lambs, due to the death of the two lambs in the birth period and some other six later. GFW data of 111 head

Hamdani ewes were used while LWP data of 115 head Hamdani ewes were used.

Survival rates of lambs were determined according to the results of the lambing and weaning from 1th to 6th months (Kaymakçı and Sönmez 1996). The following linear model was adopted for analysis of GFW and LWP of Hamdani ewes $Y_{ijk} = \mu + a_i + b_j + e_{ijk}$

Where; Y_{ijk} is GFW or LWP of ewes, μ is the overall mean, a_i is the effect of dam age ($i= 2-4$), b_j the effect of birth type ($k= 1$ (single); 2 (twin)), e_{ijk} = independent and random error.

The present data were analyzed with General Linear Model procedure of SAS (2006) program in order to obtain least square means and standard errors of subgroups and to investigate the significance of differences among the means of subgroups. Mean separation was performed by using the Duncan's Multiple Range Test (Düzgünes et al. 1987).

All procedures were performed using procedures approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee 02/05/2014 (decision number 2014/05).

RESULTS and DISCUSSION

Lamb survival rates (SRs)

The first 48 hours of a lamb's life are critical. Around 70% of lamb mortality that occurs between birth and weaning occurs within this period. Lamb survival is related to lamb birth-weight. Lamb birth weight is strongly related to the nutrition of the ewe during pregnancy, particularly late pregnancy. Poor ewe nutrition and low condition at lambing also has detrimental effects on maternal behavior and lamb behavior that contribute to increased mortality. Ideally the ewe and lamb should remain at the birth site for at least 6 hours.

Table 1. Survival rates of Hamdani ewes

Reproductive characteristics	Values (%)
Survival rates of lambs in birth (SR1)	98.5
Survival rates of lambs until 30 th day from birth (SR2)	96.2
Survival rates of lambs until 60 th day from birth (SR3)	96.2
Survival rates of lambs until 90 th (weaning) day from birth (SR4)	94.6
Survival rates of lambs until 120 th day from birth (SR5)	93.9
Survival rates of lambs until 150 th day from birth (SR6)	93.9
Survival rates of lambs until 180 th day from birth (SR7)	93.9
Survival rates of lambs until 150 th day from weaning (SR8)	99.2
Survival rates of lambs until 180 th day from weaning (SR9)	99.2

SRs for lambs are presented in Table 1. This table shows that the survival rates for lambs were calculated as: 98.5%, 96.2%, 96.2%, 94.6%, 93.9%, 93.9%, 93.9%, 99.2% and 99.2% for from birth (SR1), from birth to 1th (SR2), from birth to 2th (SR3), from birth to 3th (at weaning) (SR4), from birth to 4th (SR5), from birth to 5th (SR6), from birth to 6th (SR7), from 3th to 5th month (SR8) and from 3th to 6th month (SR9), respectively.

In the present study, the survival rates of lambs SR1, SR4 and SR7 of lambs were found 98.5%, 94.6% and 93.9% respectively. These results are higher than those reported for SR1, SR4 and SR7 on Akkaraman and varieties lambs (Kaymakçı et al. 1995; Gökdal 1998; Esen and Bozkurt 2001; Yakan et al. 2012), Bafra lambs (Güngör and Akçapınar 2013) and İvesi lambs (Üstüner and Oğan 2013). The present results obtained for SR1 and SR2 are similar to reported on Hamdani lambs (Öztürk 1998).

Grease fleece weight (GFW) and live weights at parturition (LWP) of ewes

The least square means, standard errors, tests of significance for greasy fleece weight (GFW) and live weights at parturition (LWP) of Hamdani ewes and results of Duncan's multiple range tests for lamb weights for each age of ewes and fertility status of ewes have been presented in Table 2. The adjusted values related to average greasy fleece weight (AGFW) and average live weights at parturition (ALWP) of Hamdani ewes were found to be 2.29 ± 0.13 kg and 71.57 ± 1.28 kg, respectively.

Table 2. Least squares means, tests of significance for average greasy fleece weight (GFW) and average live weight at parturition (LWP) results of Duncan's multiple range tests for Hamdani ewes each factor

Factors		GFW (kg)			LWP (kg)			
Age	N	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Min	Max	N	$\bar{X} \pm S\bar{X}$	Min	Max
2	31	2.36 ± 0.03	1.98	2.60	34	71.27 ± 0.29^c	67.21	74.20
3	55	2.30 ± 0.02	1.87	2.55	54	73.51 ± 0.21^a	70.05	77.80
4	25	2.29 ± 0.03	1.96	2.48	27	73.01 ± 0.28^b	69.35	75.11
Fertility status								
Single	96	2.29 ± 0.01	1.87	2.60	100	71.06 ± 0.13	67.21	75.40
Twin	15	2.34 ± 0.03	2.12	2.48	15	74.13 ± 0.36	70.98	77.80
Overall	111	2.29 ± 0.13	1.87	2.60	115	71.57 ± 1.28	67.21	77.80

^{a,b,c}: $p < 0.05$, Min: Minimum, Max: Maximum, N: Number of ewes

Live weights at parturition (LWP): Overall means and standard errors for LWP for both dam age and type of birth are represented in Table 2. Age of dam and the type of lambing had a significant effect on LWP ($P < 0.05$). For LWP, significant effects of age and type of birth were reported in previous studies (Fahmy and Bernard 1973; Özsoy 1974; Özsoy and Vanlı 1986) and in agreement with our results. In the present study, the overall mean of LWP (71.57 kg) in Hamdani ewes was higher to Karakaş (Gökdal 1998), Norduz (Demirel et al. 2004; Bingöl et al. 2005), Morkaraman (Aktas 2003) and Kıvrıcık (Ceyhan et al. 2007) While lower was reported for Hamdani (Demirel et al. 2000). Since there were differences in maintenance conditions and genotype, it is difficult to make direct comparisons.

CONCLUSION

This study is thought to be important, for it is the first one in which the SRs of lambs, GFW and LWP of Hamdani ewes in rural farm conditions in Hakkari region of Turkey have been searched. The results indicated that some survival rate traits and LWP of Hamdani ewes were concluded to be comparable determined by the characteristics of the study on other domestic ewe breeds. Information obtained from SRs and LWP of this indigenous sheep will be a valuable asset for the studies in this field. According to the results of this study, it can be concluded that Hamdani

sheep can successfully be raised under East Anatolian conditions.

Grease fleece weight (GFW): In the present study, the average GFW were found as 2.29 kg varied between 1.87 and 2.60 kg based on age of ewes and fertility status of ewes (Table 2). Age of ewes and the type of lambing had no significant effect on GFW. In the study groups, differences between in age and birth type were found statistically insignificant. In terms of GFW, Hamdani sheep similar to Akkaraman (Güney 1979) while longer than Karakas (Gökdal et al. 2000), Norduz (Tuncer 2008) and Hamdani ewes (Al-Barzinji 2009). On the other hand, GFW obtained in the study was lower than reported for Hamdani (Öztürk and Odabaşoğlu 2011) and Kıvrıcık ewes (Koyuncu et al. 1996; Ceyhan et al. 2003; Yılmaz et al. 2003). The results and the reports in the literature show that GFW was not only depends on the breed of sheep but depends also on the environmental and/or managerial conditions in which a sheep type/breed raised.

REFERENCES

- Aktas R (2003).** Varto yöresi Morkaraman koyunlarının büyüme-gelişme ve dış yapı özellikleri. Thesis (MSc). Yuzuncu Yil University, Van, Turkey.
- Al-Barzinji YMS (2009).** A study of some economical traits with breeding value in Hamdani sheep using molecular genetics techniques. Ph.D. Thesis, Salahaddin University, Iraq.
- Alkass JE, Juma KH (2005).** Chapter 3. Small Ruminant breeds of Iraq. In: Iniguez L (ed), Characterization of Small Ruminant Breeds in West Asia and North Africa. Vol. 1. West Asia. International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, p. 63-101.
- Aziz KO (1993).** Some wool quality traits of Hamadani sheep. *Mezopotamia J Agric*, 25, 5-9.
- Aziz KO, Al-Oramary R (2005).** A study on fleece characterization of Hamadani sheep in Erbil plain. *Mezopotamia J Agric*, 33, 5-9.
- Ceyhan A, Torun O, Erdoğan I (2003).** Imroz, Kıvrıcık ve Merinos koyun ırklarında canlı ağırlık ve yapağı özellikleri. *Çukurova Univ J Agric Sci*, 18, 101-108.
- Ceyhan A, Erdoğan I, Sezenler T (2007).** Gen kaynağı olarak korunan Kıvrıcık, Gökçeada ve Sakız koyun ırklarının bazı verim özellikleri. *J Tekirdağ Agric Faculty*, 4, 10-12.
- Demirel M, Aygün T, Altın T, Bingöl M (2000).** Hamdani ve Karakaş koyunlarında gebeliğin son döneminde farklı düzeylerde beslemenin koyunlarda canlı ağırlık, kuzularda doğum ağırlığı ve büyüme üzerine etkileri. *Türk J Vet Anim Sci*, 24, 243-249.
- Demirel M, Kurbal ÖF, Aygün T, Erdoğan S, Bakıcı Y, Yılmaz A, Ülker H (2004).** Effect of different feeding levels during mating period on the reproductive performance of Norduz ewes and growth and survival rate of their lambs. *J Biol Sci*, 4, 283-287.

- Düzgüneş O, Kesici T, Gürbüz F (1987).** Araştırma ve Deneme Metodları (İstatistik Metodları-II). Ankara Üniv. Ziraat Fak. Yay.1021, Ders Kit. 295.
- Esen F, Bozkurt T (2001).** Akkaraman ırkı koyunlarda flushing ve östrus senkronizasyonu uygulamasının döl verimi üzerine etkisi. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 365-368.
- Fahmy MH, Bernard CS (1973).** Effects of crossbreeding a certain environmental factors on multiple births. Wool production and growth in sheep. *Anim Prod*, 16, 147-155.
- Gökdal Ö (1998).** Karakaş koyunlarının süt ve döl verimleriyle dışyapı ve büyüme-gelişme özellikleri. Thesis (PhD). Yuzuncu Yil University Institute of Sciences, Van, Turkey.
- Gökdal O, Oto MM, Ulker H, Temur C, Budag C (2000).** Köylü koşullarında yetiştirilen Karakaş koyunlarının çeşitli verim özellikleri ve vücut ölçüleri. *YYU J Agr Sci*, 10, 103-111.
- Güney O (1979).** Akkaraman koyunlarının İvesi koçlar ile çeşitli verimler yönünden ıslahı olanakları. Thesis (PhD). Çukurova University, Institute of Sciences, Adana Turkey.
- Güngör I, Akçapınar H (2013).** Bafra genotipinin Ankara şartlarında verim özellikleri. *J Lalahan Livestock Res Inst*, 53, 59-73.
- Kaymakçı M (2006).** İleri koyun yetiştiriciliği, Bornova – İzmir, Turkey.
- Kaymakçı M, Sönmez R (1996).** İleri koyun yetiştiriciliği kitabı. I. Baskı, Dizgi-Baskı: Ege Üniv. Basımevi, İzmir. 359.
- Kaymakçı M, Sönmez R, Karaca O, Özder M (1995).** Türkiye koyunculuk işletmelerinin yapısal özellikleri ve verilecek yön: Türkiye Hayvancılığının Yapısal ve Ekonomik Sorunları Sempozyumu, 27-29 Eylül 1995. İzmir. Turkey, 206-210.
- Koyuncu M, Tuncel E, Ferik A (1996).** Anadolu Merinosu, Kıvrıkcık, Türkgeldi koyunlarının yapağı verim ve özellikleri üzerine bir araştırma. Uludağ of University, *J Agric Sci*, 12, 101-108.
- Magid SA, Al-Murrani WK, Alkas JI (2003).** Iraq Country Report on Animal Genetic Resources. <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1250e/annexes/CountryReports/Iraq.pdf> (Access date: 12.05.02014).
- Örkez M, Kaya F, Calta H (1984).** Kangal tipi Akkaraman koyunlarının bazı önemli verim özellikleri. *J Lalahan Livestock Res Inst*, 24, 15-34.
- Özsoy MK (1974).** Atatürk Üniversitesi Merinos sürüsünde yapağı verimi ile ilgili vasıflara tescil eden faktörlerin parametre tahminleri. *Univ Atatürk J Agric Sci*, 5, 11-64.
- Özsoy MK, Vanlı Y (1986).** Merinos, Morkaraman ve İvesi Irkları ile bunların iki-ırk ve üç-ırk melezlerinin koyun verim özellikleri bakımından değerlendirilmesi. *Turk J Vet Anim Sci*, 10, 178-192.
- Öztürk Y (1998).** Van ve yöresinde Hamdani koyunlarının verimleri ve morfolojik özelliklerinin araştırılması. Thesis (PhD). University of Yuzuncu Yil, Institute of Health Sciences, Van, Turkey.
- Öztürk Y, Odabaşoğlu F (2011).** Van ve yöresinde Hamdani koyunlarının verimleri ve morfolojik özelliklerinin araştırılması; II. kuzularda büyüme, yaşama gücü, besi performansı kesim ve karkas özellikleri. *Van Vet J*, 22, 81-87.
- Raaf SO (2005).** Estimation of genetic and phenotypic parameters for lambs growth and evaluation of Hamdani ewes for productive traits. Dissertation (PhD). Salahaddin University, Iraq.
- SAS (2006).** PC SAS User's Guide: Statistics. SAS Inst. Cary, NC, USA.
- Tuncer SS (2008).** Norduz ve Karakaş koyunlarında kıl follükülü ile yapağı özellikleri arasındaki ilişkiler. Thesis (PhD). Yuzuncu Yil University Institute of Sciences, Van, Turkey.
- TÜİK (2014).** Turkish Statistical Institute. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002. (Access date: 12.05.02014).
- Üstüner H, Oğan MM (2013).** Main productive performance of Awassi sheep in the Central Anatolian Region of Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 37, 271-276.
- Yakan A, Ünal N, Dalcı MT (2012).** Ankara şartlarında Akkaraman, İvesi ve Kıvrıkcık ırklarında döl verimi, büyüme ve yaşama gücü. *J Lalahan Livestock Res Inst*, 52, 1-10.
- Yılmaz A, Özcan M, Ekiz B, Ceyhan A, Altınel A (2003).** The body weights and wool characteristics of the indigenous İmroz and Kıvrıkcık sheep breeds of Turkey. *Int J Sheep and Wool Sci*, 51, 26-13.



The Effect of Octyl-Cyanoacrylate in Wound Healing at Closing the Experimentally Formed Skin Incision in Rabbits

Abdullah KARASU¹ Bahtiyar BAKIR²

¹ Yuzuncu Yil University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Surgery, Van, Turkey

² Gazi University, Health Services Vocational School, Ankara, Turkey

Received: 09.08.2015

Accepted: 05.10.2015

SUMMARY

In this study, it was aimed to evaluate the effect of tissue adhesive octyl-cyanoacrylate (OCA) at wound healing in closing the incisional skin wounds in rabbits. 24 healthy rabbits were used as study material. Two parallel full-thickness skin incisions with 6 cm length were performed under aseptic conditions on the left and right sides of each experimental rabbit dorsum and immediately subcutaneous connective tissue of all wounds were sutured by simple continuous suture pattern with 3/0 chromic gut. The right side skin incision (control group) sutured by seven simple sutures with 3/0 silk. The skin incisions at the left (OCA group) were closed with OCA tissue adhesive after approximate the wound edges with forceps and fingers. Six rabbits were anesthetized on days 3, 7, 14 and 21 after surgery. Skin wounds were removed both from the OCA and suture applied wounds which was 3 cm width and 6 cm length. They were used for histopathologic evaluation, tensile strength and hydroxyproline measurement. It was macroscopically observed that the inflammatory reaction and scab formation in the OCA group was less and the scar formation was similar and better in some regions compared to the control group. It was also microscopically determined in the OCA group that the inflammatory reaction on postoperative days of 3 and 7 was less formed and the collagen formation was less on postoperative days of 14 and 21 compared to the control group. The wound tensile strength didn't statistically different between the groups. It was determined that the hydroxyproline levels in OCA group were higher on postoperative days of 3 and 7 and there was no difference on postoperative days of 14 and 21. In conclusion, OCA tissue adhesive could be used in closing the incisional skin wounds in the small animal together with the subcutaneous suture.

Key Words: Octyl-cyanoacrylate, Wound healing, Rabbit

ÖZET

Tavşanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Deri Ensizyonlarının Kapatılmasında Oktil-Siyanoakrilatın Yara İyileşmesi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada tavşanlarda oluşturulan ensizyonel deri yaralarının kapatılmasında oktil-siyanoakrilat (OCA) doku yapıştırıcısının yara iyileşmesine etkilerinin araştırılması amaçlandı. Çalışmanın materyalini 24 adet sağlıklı tavşan oluşturdu. Tavşanların bel omurları çizgisinin iki yanında ve birbirine paralel 6 cm uzunluğunda tam kalınlıkta deri ensizyonları oluşturuldu. Tüm yaraların deri altı bağ dokusuna 3/0 krome katgüt iplik ile basit sürekli dikiş uygulandı. Sağ taraftaki deri ensizyonları (kontrol grubu), 3/0 ipek iplikle basit ayrı dikiş uygulanarak kapatıldı. Sol taraftaki deri ensizyonları ise (çalışma grubu), yara dudakları forseps veya parmaklarla karşı karşıya getirildikten sonra OCA doku yapıştırıcısı ile kapatıldı. Postoperatif 3, 7, 14 ve 21. günlerde 6'şar adet tavşan anestezi edilerek, histopatolojik değerlendirme, gerilim direnci ve hidroksiprolin ölçümünde kullanılmak üzere hem OCA hem de dikiş uygulanan yara hattını içine alacak şekilde 3 cm genişliğinde ve 6 cm uzunluğunda dokular alındı. Makroskobik olarak çalışma grubunda kontrol grubuna göre yangısal reaksiyonun ve kabuk oluşumunun daha az, skar oluşumunun ise bazı bölgelerde benzer ve bazı bölgelerde ise daha iyi olduğu gözlemlendi. Mikroskobik olarak çalışma grubunda kontrol grubuna göre postoperatif 3. ve 7. günlerde yangısal reaksiyonun daha az şekillendiği ve postoperatif 14. ve 21. günlerde kollajen yapının daha az olduğu belirlendi. Yara gerilim direncinin gruplar arası istatistiksel değerlendirmede farklılık arz etmediği belirlendi. Hidroksiprolin düzeylerinin çalışma grubunda kontrol grubuna göre postoperatif 3. ve 7. günlerde yüksek olduğu, 14. ve 21. günlerde ise farklılık arz etmediği saptandı. Sonuç olarak; küçük hayvanlarda ensizyonel deri yaralarının kapatılmasında OCA doku yapıştırıcısının deri altı dikişi ile birlikte hareketsiz bölgelerde kullanılabileceği kanısına varıldı.

Anahtar Kelimeler: Oktil-siyanoakrilat, Yara iyileşmesi, Tavşan

INTRODUCTION

Today, the classic suture has still a wide usage in surgery and wound repair. But it was also known that it has some

disadvantages such as granuloma and fistula formation because of the tissue incompatibility, also dehiscence of wound because of the loose sutures, leaks in organs with lumens, the delays in wound healing linked to ischemia

because of tight applications and long application duration (Spotniz et al. 1997; Scardio et al. 1999). These disadvantages directed the scientists to search an adhesive material which enables the atraumatic tissue union (Scardio et al. 1999). Presented tissue adhesive cyanoacrylate (CA) is used for closing the skin wounds and started to be used as tissue adhesive in 1950's (Toriumi et al. 1990). The liquid CA tissue adhesive was stucked firmly to the skin by hardening and turning into polymer structure when it is applied to the damp skin and it holds together the wound edges by combining them each other at the recuperation period (Lehnhardt 2000). In the previous studies, the first synthesized short chain CA derivations of methyl-cyanoacrylate and ethyl- cyanoacrylate were determined as toxic to the tissue and its usage was limited in surgery (Mattick 2002; Narang et al. 2003). Nowadays practically, OCA which is a longer chain CA derivative has been successfully used in human medicine for closing the skin incisions. Furthermore, it is known that OCA has some advantages such as having a more flexible formation than the other CA derivatives (Singer et al. 2002; Eaglstein and Sullivan 2005), and enabling to close longer incisions (Mattick 2002), having non-toxic and non-carcinogenic effect because of its topical application (Singer et al. 2002; Vauthier et al. 2003) and having 3-4 times more tensile strength than the BCA (Petratos et al. 2002; Eaglstein and Sullivan 2005). It is also known, OCA has some advantages such as shortening the operation duration in skin wound closure because of its easiness and fast usage (Singer and Thode 2004), having hemostatic effect (Nguyen et al. 2002; Singer et al. 2004) and having no need for dressing material for closure in the healing period (Singer and Thode 2004). OCA has also an antibacterial effect and preventing the wound contamination (Narang et al. 2003; Singer et al. 2003; Singer and Thode 2004), optimal wound dressing during healing period while keeping the surrounding moisten (Singer and Thode 2004). Additionally, it has no need for removing sutures and its self-removal on days 5-10 after the application (Singer et al. 2002; Singer and Thode 2004), having less infection percentage compared to classic suture (Singer et al. 2003; Singer and Thode 2004,) and less tissue reaction embodiment (Singer et al. 2003).

In the present study, it was aimed to determine the feasibility of the usage of OCA tissue adhesive in practice, its contribution to the wound repair at skin incision in rabbits and the evaluation of the material with the clinic, biometric, biochemical and histopathologic diagnosis.

MATERIALS and METHODS

In this study, 24 cross-bred rabbits with different gender at the age of 12-20 months and 2,3 - 2,85 kg weight were used. The rabbits were kept in separate cages in Yuzuncu Yil University Veterinary Faculty, Research and Practice Hospital. The animals were kept in the same environment for at least one month for physiologic adaptation before the beginning of the study. At the end of this period, clinical and parasitological examination of the study group were performed. The rabbits found as healthy after the clinical examination were included to the study. The rabbits were fed by commercial pelleted diet (Purina) and water *ad libidum*. The study protocol was approved by the University of Yuzuncu Yil's Ethical Committee and the experiments were conducted in accordance with animal protection laws.

Wound creation: The rabbits were weighed and anesthetized by intramuscular injection of a combination of 50 mg/kg of ketamine hydrochloride (Ketamidol, Richterpharma) and 5 mg/kg of xylazine hydrochloride

(Rompun, Bayer). Rabbits were positioned in ventral recumbency. Two parallel full-thickness skin incisions with 6 cm length were performed under aseptic conditions on the left and right sides of each experimental rabbit dorsum and immediately subcutaneous connective tissue of all wounds were sutured by simple continuous suture pattern with 3/0 chromic gut. The right side skin incision (control group) sutured by seven simple sutures with 3/0 silk. The skin incisions at the left (OCA group) were closed with OCA (Dermabond-Ethicon) tissue adhesive by application through the incision line after approximate wound edges with forceps and fingers. After the hardening of first adhesive layer, one thin layer was applied through the incision line by paying ultimate attention not to have any leakage to the wound edges.

Suture applied wounds were dressed for 3 days in postoperative period. In the postoperative period, the wounds with OCA were not covered with any dressing material or applied any medicine.

Removal of skin wound: Six rabbits were anesthetized on postoperative days 3, 7, 14 and 21. Skin wounds removed both from the OCA and suture applied wounds which was 3 cm width and 6 cm length (Figure 1). They were used for histopathologic evaluation (Figure 1/a), tensile strength (Figure 1/b) and hydroxyproline measurement (Figure 1/c).

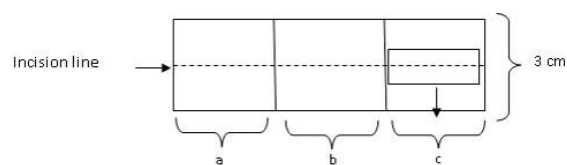


Figure 1. Postoperative wound evaluation (a: histopathological evaluation b: wound tensile strength measurement c: hydroxyproline assay)

Macroscopic examination: The scar formation and the inflammatory differences on the wound edges, the presence of complications such as dehiscence of wound and infection were evaluated and photographed.

Histopathologic examination: On postoperative days of 3, 7, 14 and 21, the tissue samples were taken both from the OCA and suture applied wounds which consist of the wounded and healthy tissue (Figure 1/a). After they were fixed with 10% formaldehyde. The tissue samples were evaluated about regarding the inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation, angiogenesis, collagen development and epithelialization.

Measuring the wound tensile strength: The mechanic wound tensile strength (Figure 1/b) was estimated on postoperative days 3, 7, 14 and 21 (Baie and Sheikh 2000) with a mechanic tensiometer similar with the one used in Borden et al. (1995) studies.

Determination of hydroxyproline: The skin samples were taken from the wounds (Figure 1/c) on postoperative days 3, 7, 14 and 21 and preserved in normal saline at -18°C until hydroxyproline quantity was measured. The hydroxyproline level was measured based on the photometric principle method of hydroxyproline oxidation with chloramine T and the color compound formed with dimethylaminobenzaldehyde (Anonymous 1997).

Statistical analysis: All the values were recorded as mean \pm standard error mean (mean \pm S.E.M.). The statistical evaluation of the obtained data was performed with independent *t* test for determine the statistical difference between the wounds closed with OCA and sutured by SPSS

Packet Program. The $p < 0.05$ was considered as statistically important.

RESULTS

Macroscopic findings: It was determined that OCA application was easier and had shorter application time compared to suturing. It was observed that must needs to close a wound with OCA (2.47 ± 0.83 sec) is statistically shorter than suture (3.76 ± 0.97 sec) ($p < 0.001$). It was determined that the adhesive covers the incision line as a thin film layer and hold the wound edges together. The sutures in the control group were taken out at the 7th postoperative day. Two rabbits died in 4-6 hours after the operation probably because of the anesthesia. The five sutured and OCA applied wounds ($n=5$) were evaluated on postoperative days 14 and 21. Partial blood clot was observed on the wound edges in control group on the 3rd postoperative day. Furthermore, slight inflammatory reactions were determined around the suture, while no inflammatory reactions were observed in the wounds closed with OCA wound edges. On the 7th postoperative day, necrotic wound remains were observed on the incision line in the control group. Epithelization was seen in the regions without crust. In the OCA applied wounds, it was observed that the epithelization was better than the suture applied wounds. Besides it was also observed in some cases that there were some wound crust formations on some points through the incision line.

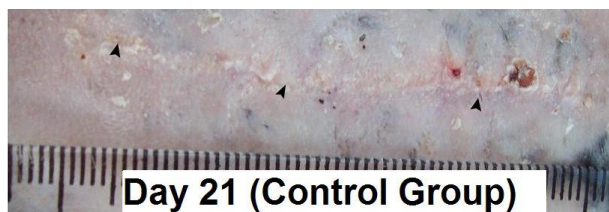


Figure 2. The view of the wound in control group at the 21 postoperative day (arrows: scar line)

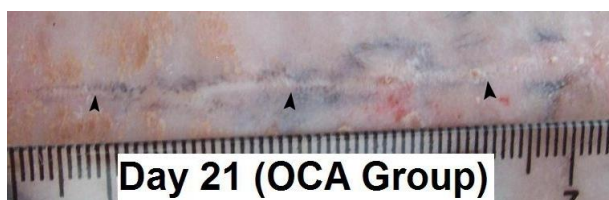


Figure 3. The view of the wound in OCA group at the 21 postoperative day (arrows: scar line)

Additionally, it was determined that the wound line was more regular than the control group. On the 14th postoperative day, it was determined that the epithelization was completed in the control group wounds but it was observed that necrotic wound formation continued in some regions. In the OCA applied wounds, it was determined that epithelization was more proper and completed earlier than the control group. It was observed in the 21st postoperative day that the scar tissue in the OCA applied wounds was better than in the suture applied. Besides it was observed that the adhesive applied to the skin didn't go off from some parts of the skin. It was not observed any infection in the during recovery period in both groups which could need treatment such as wound opening or any obvious inflammatory reaction (Figure 2 and Figure 3).

Table 1. Wound hydroxyproline findings and tensile strength

Parameter	Control group (mean \pm S.E.M)	OCA group (mean \pm S.E.M)
Hydroxyproline (mg/g)		
Day 3 (n=6)	25.22 \pm 0.77	28.03 \pm 0.95*
Day 7 (n=6)	38.99 \pm 0.41	41.38 \pm 0.87*
Day 14 (n=5)	47.03 \pm 0.70	45.62 \pm 0.77
Day 21 (n=5)	43.48 \pm 1.13	42.16 \pm 1.07
Tensile strength (g/mm²)		
Day 7 (n=6)	9.23 \pm 0.74	10.58 \pm 0.61
Day 14 (n=5)	57.61 \pm 2.63	52.23 \pm 2.11
Day 21 (n=5)	113.79 \pm 6.44	99.71 \pm 5.06

Histopathologic findings: During histopathologic examination of the tissue samples taken in the 3rd, 7th, 14th and 21st days of wound healing period, regional bleedings and a thick acute inflammatory reaction including neutrophil leukocytes on both sides of incision line starting from lamina epithelia in the control group on the 3rd day were observed. In the OCA group, it was determined that the bleeding and the acute inflammatory focuses were less than in the control group. On the 7th day postoperative, it was determined in the control group that the incision area was still open in the lamina epithelia despite the regeneration. Large necrotic areas on the lamina epithelia and on the incision line starts from lamina epithelia until tunica serosa were observed. Thick inflammatory exudates and intense bleeding foci around the necrosis were encountered. It was observed endothelial cell and fibroblast proliferation in the lamina propria. It was determined that the inflammatory reaction and the necrosis in the OCA group were fairly less than in the control group. On the postoperative day 14th, it was observed that the incision line was totally closed and epithelization was completed in the OCA group. It was observed that lamina propria was filled with fibroblasts rich chronic granulation tissue and little amount of neutrophil leukocytes. It was observed in the control group that regeneration was formed on epidermis in the incision area and epithelization was completed. But necrotic tissue presence was observed in some areas on the healthy epidermis layer around the incision line and partially through the epithelium. It was observed in the lamina propria that there were endothelium proliferation and a chronic granulation tissue which is rich with fibrosis and fibroblasts. It was determined that the connective tissue activation is fairly better than OCA group. On the 21st postoperative day, it was seen that regeneration in epidermis in both group was completed. It was followed on the incision applied dermis that there were connective tissue cells, capillary vein with empty lumen and chronic granulation tissue formation with collagen fibers. In the OCA group, the epithelization was more properly formed than in the sutured group and fibroblast proliferation was observed. It was determined that fibroblast proliferation and collagen structure in control group were richer than the OCA group.

Wound tensile strength and hydroxyproline findings: The wound tensile strength and hydroxyproline amounts belonging to control and OCA groups were presented in Table 1.

DISCUSSION

Wound treatment was the main interest area of the researchers since the beginning of medicine history. Despite, different suture materials and techniques were successfully applied. It is known that OCA can be an alternative application to the suture because it is quick and handy application. It shortens the surgery time, provides homeostasis, prevents the wound contamination and increases the wound healing (Colak et al. 1997; Ollivier et al. 2001; Kim and Gupta 2003; Singer and Thode 2004; Faria et al. 2005.).

For this reason, the presence of the tissue adhesive OCA on skin incision in the study material was evaluated with macroscopic, histopathological, biomechanical and biochemical evaluations. In this study, it was observed that the tissue adhesive statistically shortens the surgery ($p < 0,001$). It was also observed that OCA was more practical and easier in application than the suture. These evaluations are mostly similar to reference (Ollivier et al. 2001; Kim and Gupta 2003; Faria et al. 2005).

In this study, it was showed in the control group that the bleeding and the crust formation during the inflammation and proliferation phases (3rd and 7th postoperative days), the inflammatory reaction formation around the suture, exudation between wound edges and the irregular scare formation were more present than the OCA group.

These results are comparable with the researchers' (Spotniz et al. 1997; Scardio et al. 1999) it can occurred because of the trauma caused by the needle passing through tissues during suture and because of the exudate between the two sutures. Despite postoperative care was taken to the wounds during recovery period, it was determined that the wound crust formation and bleeding were less and there was no inflammatory reaction. It was observed in the maturation period (14th and 21st postoperative days) that the epithelialization in the OCA group was formed faster than the control group, the wound line was more proper and the scar tissue was stronger. This situation can be explained as the adhesive protects the wound line as a natural covering material during healing process while both inhibiting the wound contamination and keeping the wound line damp which leads the capillaries have a quick and early formation (Bello 2002; Singer et al. 2003). In researches performed by Dalvi et al. (1986) in humans and Hampel et al. (1991) in rabbits was found that the macroscopic inflammatory reaction in OCA group was less than the suture group and the skin surfaces were flatter. In the study about the evaluation of the effect of BCA and silk suture on skin incision during wound healing (Colak et al. 1997); it was found that any distinctive inflammation and dehiscence on the wound edges in the BCA group were not macroscopically observed. In our study, the results were similar to other researcher (Dalvi et al. 1986; Hampel et al. 1991; Colak et al. 1997).

In this study, any dehiscence of wounds in the OCA group which need futures treatment was observed in the early and late periods of wound healing. Our results are similar with the reports of the authors (Colak et al. 1997; Lehnhardt 2000; Singer et al. 2002; Singer and Thode 2004) which found that the ratio of the dehiscence of wounds in the wounds closed with CA adhesives need medical treatment was rather low. All the suturing materials are artificial substances for the tissues and cause direct tissue reaction (Nomori et al. 2000). The polymorph nuclear leukocyte infiltration between the 1-4 days of implantation and macrophage infiltration between the 4-7 days are

histologically formed in the tissues against suture material (Lomborn et al. 1970).

In the control group, the presence of acute inflammatory infiltration in the early phases of wound healing is similar to the references (Nomori et al. 2000).

BCA and silk suture on the wound healing was found that the inflammatory reaction in the BCA applied wounds in the early phases of the wound healing was less present and there was no any difference in the 21st postoperative day between the groups (Nomori et al. 2000; Borba et al. 2000).

It was found during an experimental study in the cats that the morphologic effects of suture and BCA tissue adhesive in closing the skin incisions were discussed that it was not observed any differences between the groups in the postoperative days 14th and 21st (Queiroz et al. 2001). In this study, the histological findings are compatible with many references (Borba et al. 2000, Queiroz et al. 2001; Bello 2002). In the present study, the foreign body reaction due to the external usage of the OCA tissue adhesive and any presence of toxic effects show similarities with the references (Gueiros 2001).

It is known that CA has effect on the gram positive (Eaglstein and Sullivan 2005) and negative bacteria (Toriumi et al. 1990; Singer and Thode 2004). Narang et al. (2003) found that OCA has a wonderful antimicrobial characteristic against gram positive and some gram negative bacteria. In this study, the first 3 days' covering of the control group were done despite the OCA group wounds were not covered and no infection was present in any wound in the postoperative time. This situation can be explained by OCA's antibacterial properties (Toriumi et al. 1990; Narang et al. 2003; Singer and Thode 2004; Eaglstein and Sullivan 2005).

The important result of the wound healing period after surgery is the wound tension force's comes to the normal tissue surface (Engin 2004). It is found that the regeneration tie and quality in the closed incise wounds healing were examined by measuring the best tensile strength (Tekin et al. 2001). Skin incisions in rats were closed with different suture materials, BCA (Toriumi et al. 1990; Kothe et al. 2000) and OCA (Petratos et al. 2002); it was found that there was no difference between the wounds closed with tissue adhesives and the suture regarding the wound tension in the 7th (Petratos et al. 2002), 14th (Kothe et al. 2000), 7th and 20th postoperative days (Toriumi et al. 1990). On the other hand, it was found that the wound tension in the incisional wounds in the rats which was closed with CA derivatives (by applying between wound edges) was statistically less important than the wounds closed with suture (Lomborn et al. 1970) in the 7th and 28th postoperative days. It was determined that the wound tension of OCA group in the 7th postoperative day was slightly more than the control group despite there was no statistical difference. This situation was explained by the strong adhesion on the wound edges caused by adhesive do not come off completely from the wound line (Lomborn et al. 1970) and the inflammatory reaction's being less (Schwarz et al. 1995). However, the wound breaking strength in the 14-21 postoperative days which is similar with histopathologic findings was not found statistically important despite it was less in the OCA group than the control group. This reduction can be explained with the correlation between collagen accumulation and wound tension (Nayak et al. 2006). Our findings were similar with many references (Toriumi et al. 1990; Kothe et al. 2000; Petratos et al. 2002) and different from other (Lomborn et al. 1970). This difference can be because of precise

application, not to have the adhesive leakage between wound edges and OCA's having more tension resistance than the other CA derivatives. In this study, the wound resistance showed less progress in the inflammation phase and increasing progress in proliferation phase. This situation can be explained with the existence of the fibrin clot between the wound edges which provides a weak wound strength in the inflammatory phase of wound healing and the increase of the collagen amount which is responsible for the wound strength in the following phases (Jorgensen et al. 1987; Pascoe 1991; Engin 2004).

Collagen consists of 9% hydroxyproline opposite from the other proteins and this amino acid can be hardly found in other proteins (Lomborn et al. 1970; Engin 2004). Hydroxyproline is important in stabilization of collagen triple helix formation (Lomborn et al. 1970). It is reported that the hydroxyproline measurement is directly proportional with the collagen amount (Jorgensen et al. 1987). In this study, hydroxyproline amount in 3rd and 7th postoperative days in OCA group was statistically higher to a considerable extend ($p < 0.05$) than in control group. The lower hydroxyproline values in control group can be explained with the procollagen breakdown (Schwarz et al. 1995) parallel with collagenase, elastase and hydrolyses enzymes increase (Demir et al. 2004) with the result of protease activity induction (Schwarz et al. 1995) of the having much inflammatory reaction (Schreiber et al. 2005; Muehlberger et al. 2005). In our study, it was found that there was no statistical difference in hydroxyproline amount between the groups in the 14th and 21st postoperative days and there was no correlation between hydroxyproline and the wound resistance. The data can be explained by the wound resistance because of the increase of the present collagen intra-inter molecular covalent bonds and related with collagen fiber order and maturation (Pascoe 1991, Engin 2004).

It was understood that OCA tissue adhesive, which is used to close the incisional wounds with a thin layer film application, following subcutaneous suture, can be used in the incisional wound closing during small animal surgeries together with subcutaneous suture in the inactive areas.

REFERENCES

- Anonymous (1997).** Et ve et mamulleri - hidroksiprolin muhtevasi tayini, TSE 6236, ISO 3496.
- Baie SH, Sheikh KA (2000).** The wound healing properties of Channa striatus-cetrimide cream-tensile strength measurement. *J Ethnopharmacol*, 71, 93-100.
- Bello TR (2002).** Practical treatment of body and open leg wounds of horses with bovine collagen, biosynthetic wound dressing and cyanoacrylate. *J Equine Vet Sci*, 22(4), 157-164.
- Borba CC, Roubaud net weight AND, Val RLR, et al. (2000).** Use of cyanoacrylate the surgical adhesive in rats skin incisions: experimental study. *Acta Cir Bras*, 15(1), 48-54.
- Borden EB, Sammartano RJ, Dembe, Boley SJ (1985).** The effect of metronidazole on wound healing in rats. *Surgey*, 97(3), 331-336.
- Colak A, Okumuş Z, Aslan S (1997).** Use of Enbucrilate in the closing of skin incisions in dogs. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 3(1), 43-47.
- Dalvi A, Faria M, Pinto A (1986).** Non-suture closure of wound using cyanoacrylate. *J Postgrad Med* 32(2), 97-100.
- Demir H, Yaray S, Kirnap M, Yaray K (2004).** Comparison of the effects of laser and ultrasound treatments on experimental wound healing in rats. *J Rehabil Res Dev*, 41(5), 721-728.
- Eaglstain W, Sullivan T (2005).** Cyanoacrylates for skin closure. *Dermatol Clin*, 23, 193-198.
- Engin A (2004).** Yara iyileşmesi. In: Temel Cerrahi, Sayek İ. (Ed), 266-277, Güneş Kitabevi, Ankara.
- Faria MCF, de Almeida FM, Serrao ML, de Oliveria Almeida NK, Labarthe N (2005).** Use of cyanoacrylate in skin closure for ovariohysterectomy in a population control programme. *J Feline Med Surg*, 7, 71-75.
- Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte TS, Franco KL (2001).** Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats. *Cienc Rural*, 31(2), 285-289.
- Hampel NL, Johnson RG, Pijanowski GJ (1991).** Effects of isobutyl-2-cyanoacrylate on skin healing. *Compend Contin Educ Pract Vet*, 13(1), 80-83.
- Jorgensen PH, Jensen K, Andreassen TT (1987).** Mechanical strength in rat skin incisional wounds treated with fibrin sealant. *J Surg Res* 42(3), 237-241.
- Kim YM, Gupta BK (2003).** 2-octyl cyanoacrylate adhesive for conjunctival wound closure in rabbits. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*, 40(3), 152-155.
- Kothe W, Patzelt K, Anke H, Theel L (2000).** Hautklebungen an der ratte zschr. *Chirurgie*, 93, 197-204.
- Lehnhardt FJ (2000).** Report on experience with the application of tissue adhesives in experimental and small animal surgery. *Ir Vet J*, 50(2), 99-106.
- Lomborn PB, Soloway HB, Matsumoto T, Aaby GV (1970).** Comparison of tensile strength of wounds closed by sutures and cyanoacrylates. *Am J Vet Res*, 31(1), 125-130.
- Mattick A (2002).** Use of tissue adhesives in the management of paediatric lacerations. *Emerg Med J*, 19, 382-385.
- Muehlberger T, Moresi JM, Schwarze H, Hristopoulos G, Laenger F, Wong L (2005).** The effect of topical tretinoin on tissue strength and skin components in a murine incisional wound model. *J Am Acad Dermatol* 52(4), 583-588.
- Narang U, Mainwaring L, Spath G, Barefoot J (2003).** In-vitro analysis for microbial barrier properties of 2-octyl cyanoacrylate-derived wound treatment films. *J Cutan Med Surg*, 7(1), 13-19.
- Nayak S, Nalabothu P, Sandiford S, Bhogadi V, Adogwa A (2006).** Evaluation of wound healing activity of Allamanda cathartica L. and Laurus nobilis L. extracts on rats. *BMC Complement Altern Med*, 6(12), 1-6.
- Nguyen AJ, Baron TH, Burgat LJ, Leontovich O, Rajan E, Gostout CJ (2002).** 2-octyl-cyanoacrylate (Dermabond), a new glue for variceal injection therapy: Results of a preliminary animal study. *Gastrointest Endosc* 55(4), 572-575.
- Nomori H, Horio H, Suemasu K (2000).** The efficacy and side effects of gelatin-resorcinol formaldehyde gluteraldehyde (DRFG) glue for preventing and sealing pulmonary air leakage. *Surg Today*, 30(3), 244-248.
- Ollivier F, Delverdier M, Regnier A (2001).** Tolerance of rabbit cornea to n-butyl-ester cyanoacrylate adhesive (Vetbond®). *Vet Ophthalmol*, 4(4), 261-266.
- Pascoe JR (1991).** Wound healing. In: Atlas of Small Animal Surgery, Gourley I.M., Gregory C.R. (Eds), 2-13, Gower Medical, New York.
- Petratos BP, Rucker GG, Soslow R.A, Felsen D, Poppas DP (2002).** Evaluation of octylcyanoacrylate for wound repair of clinical circumcision and human skin incisional healing in a nude rat model. *J Urol*, 167(2), 677-679.
- Scardino MS, Swaim SF, Morse SB, Sartin EA, Wright JC, Hoffman CE (1999).** Evaluation of fibrin sealants in cutaneous wound closure. *J Biomed Mater Res*, 48, 315-321.
- Schreiber J, Efron PA, Park JE, Moldawer LL, Barbul A (2005).** Adenoviral gene transfer of an NF-κB super-repressor increases collagen deposition in rodent cutaneous wound healing. *Surgery*, 138 (5), 940-946.
- Schwarz DA, Lindblad WJ, Rees RS (1995).** Altered collagen metabolism and delayed healing in a novel model of ischemic wounds. *Wound Repair Regen*, 3, 204-212.
- Singer AJ, Quinn JV, Clark RE, Hollander JE (2002).** Closure of lacerations and incisions with octylcyanoacrylate: A multicenter randomized controlled trial. *Surgery* 131(3), 270-276.
- Singer AJ, McClain SA, Katz A (2004).** A porcine epistaxis model: Hemostatic effect of octylcyanoacrylate. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 130(5), 553-557.
- Singer AJ, Thode HC (2004).** A review of the literature on octylcyanoacrylate tissue adhesive. *Am J Surg*, 187, 238-248.
- Queiroz GF de, Paula VV de, Reis RK, Dos, Tabosa IM (2001).** Employment of n-butyl-2-cyanoacrylate adhesive and nylon for skin closure in cats. *Rev Bras Med Vet* 23(3), 126-129.
- Tekin E, Taneri F, Ersoy E et al. (2001).** The effects of glutamine-enriched feeding on incisional healing in rats. *Eur J Plast Surg*, 23, 78-81.
- Toriumi DM, Raslan WF, Fredman M (1990).** Histotoxicity of cyanoacrylate tissue adhesives. A comparative study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 116, 546-550.





Effects of N Acetylcysteine on Expression and Localization of Some Lectins in The Liver of Experimental Hepatic Intoxication

Dua DANJOLLI¹ Hasan AKSIT²

¹ Balıkesir University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Balıkesir, Turkey

² Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Biochemistry, Balıkesir, Turkey

Received: 17.08.2015

Accepted: 13.10.2015

SUMMARY

The aim of this study was to investigate the effects of intraperitoneal applications NAC that is a GSH precursor, determine the effects of some lectins expression and localization of the liver. Liver toxicity of CCl₄ in rats in order to create, intraperitoneal (i.p.) 1 ml/kg 1/1 ratio of olive oil in the form of solution injected 3 times with an interval of one day. 24 hours after CCl₄ injection, liver tissue taken under ether anesthesia. In order to determine the protective effect of N Acetyl Cysteine, N Acetyl Cysteine application (i.p. 50 mg/kg/day) 3 days prior to CCl₄ injection started and continued during the experimental period. Animals liver tissue were taken 24. hours after the last injection under the ether anesthesia. Galactose (EEL), Lactose (R II) and Mannose (GNL) specific oligosaccharides were determined using biotinylated labeled lectins in liver tissue sections. Evaluation of the reaction was performed by light microscopy. Histochemically, the reactions have been observed in centrilobular vein sinusoidal capillaries of liver tissue. No staining was detected in hepatocytes. Compared with controls, CCl₄ group were more intense staining. NAC reduced the staining intensity. As a result, cells increase their oligosaccharide units to protect them self from the liver damage of CCl₄. It was observed that NAC had protective and therapeutic effects against damage induced by CCl₄ in rats hepatic cells.

Key Words: CCl₄, EEL, GNL, NAC, Rat, RCA I

ÖZET

Deneysel Karaciğer İntoksikasyonunda N Asetil Sisteinin Karaciğerdeki Bazı Lektinlerin Ekspresyonu ve Lokalizasyonu Üzerine Etkileri

Yapılan çalışmada karaciğer dokusunda, GSH öncüsü NAS intraperitoneal uygulamalarının, karaciğerdeki bazı lektinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla, sıçanlara CCl₄, periton içi (i.p.) 1 ml/kg 1/1 oranında, zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde, birer gün ara ile 3 defa enjekte edildi. CCl₄ enjeksiyonundan 24 saat sonra eter anestezisi altında, karaciğer dokusu alındı. N Asetil Sisteinin koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla, NAS uygulaması (periton içi 50 mg/kg/gün) CCl₄ enjeksiyonundan 3 gün önce başladı ve deney süresince devam etti. Hayvanların son enjeksiyondan 24 saat sonra eter anestezisi altında karaciğer dokuları alındı. Karaciğer dokusundan alınan kesitlerde Galaktoza (EEL), Laktoza (RCA I) ve Mannoza (GNL) spesifik oligosakkarit üniteleri biotinlenmiş işaretli lektinlerin kullanılması ile belirlendi. Reaksiyonların değerlendirilmesi ışık mikroskopunda gerçekleştirildi. Histokimyasal olarak reaksiyonlar; sentralobüler damar ve karaciğer dokusunun, sinüsoidal kapillerlerinde gözlemlendi. Hepatositlerde boyanma tespit edilmedi. Kontrollere göre CCl₄ grubunda, daha yoğun bir boyama tespit edildi. NAS ise boyama yoğunluğunu azalttı. Sonuç olarak, hücrelerin CCl₄'e bağlı karaciğer hasarından kendilerini korumak için oligosakkarit ünitelerini artırdığı görüldü. NAS'ın, sıçanların hepatik hücrelerinde CCl₄ ile oluşturulan hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: CCl₄, EEL, GNL, NAS, Rat, RCA I

GİRİŞ

Karaciğer, karın boşluğunda yer alan en büyük iç organ olarak önemli fonksiyonlar gösterir (Kayalı 1992).

Karaciğer sirozu, çok çeşitli nedenlerden kaynaklanan kronik karaciğer hastalıklarının son patolojik yoludur (Qua ve Goh 2011).

Corresponding author: Hasan AKSIT

Balıkesir Üniv., Veteriner Fak., Biyokimya AD, Balıkesir, Turkey

e-mail: hasanaksit@balikesir.edu.tr

Deneyisel karaciğer sirozun oluşumunda kullanılan kimyasallardan biri karbon tetraklorürdür (CCl₄). Karbon tetraklorür renksiz, şeffaf, kolay buharlaşan ve yanıcı olmayan bir sıvıdır (Kus ve ark. 2005).

N Asetil Sistein (NAS), L-sisteinin N asetillenmiş türevidir olup moleküler yapısı sayesinde hücrelere kolayca girerek ve önemli bir antioksidan olan glutatyon (GSH) oluşumunda öncül rol oynadığı, oksidan strese karşı dokuların savunmasını desteklediği, yapısında bulunan serbest tiyol grupları ile direkt antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir (Sener ve ark. 2003; Zafarullah ve ark. 2003).

İlk defa 1888'de Stillmark tarafından 'Ricin' ismi ile bilinen ve toksik etkisi olan bitkiden elde edilerek eritrositleri çoğalttığı bilinmektedir (Kilpatrick 2002). Lektin kelimesinin anlamı, seçmektir ve Latince kökenlidir (Franz 1986). Lektinler; bakteriler, bitki, virus, mantar, insan ve hayvanlarda değişik çeşitlerde bulunurlar (Bulgakow ve ark. 2004).

Lektinler, patolojik dokular ile normal dokular arasındaki farklılıkların tespit edilmesinde, hastalıkların teşhis edilmesinde, biyokimya, hücre biyolojisi, immunoloji gibi alanlarda ve histokimyasal boyamalarda kullanılırlar (Scillitani ve ark. 2007).

Lektinlerin histokimyada çokça kullanılmasının nedeni, glikolipid ve glikoproteinlerin ucunda bulunan karbohidratlara bağlanmaları ve hücreye yerleşmeleridir (Murnane ve ark. 1989).

Hücrelerin yüzey reseptörlerindeki karbohidrat birimlerine bağlanan lektinler, hücrelerin çökmelerine neden olan moleküllerdir (Lis ve Sharon 1986). Bir lektinin, karbohidrat zincirlerinden sadece birine bağlanması, aglutine edici etkisinin şekillenebilmesi için yeterli olmayıp, en az iki karbohidrat yapısına bağlanması gerekir. Lektinler, kendilerine spesifik olan monosakkaritler ile etkileşime girerler (Basu ve ark. 1987; George ve ark. 2007). Hücre yüzeyindeki oligosakkaritlere bağlanırlar ve böylece hücrelerin farklılaşmasını, gelişmesini, biyolojik bilgilerini kodlanarak iletilmesini, değişik patolojilere yanıt vermesini gerçekleştirirler. Lektinler ve tanıdıkları hücre içi ve dışı reseptörler ile ilgili yapılan çalışmalar, bu nedenle giderek önemsenmektedir (Harrison 1991).

Lektinler, hücrelerarası iletişim ve ilişki kurulması, dokuların şekillenmesinde oldukça önem taşımaktadır. Membran yüzeylerindeki siyalik asitin yarattığı negatif yükten dolayı, hücrelerin hemen hepsi birbirleriyle doğrudan iletişim sağlayamazlar. Hücreler iletişimlerini zarlardaki karbohidratlar, lektinler, laminin gibi birçok aracı molekül üzerinden kurarlar (Wieser ve Brunner 1982).

Yapılan çalışmada karaciğer dokusundaki hücrelerin, hücre yüzeyi ve ekstrasellüler matriksinde bulunan glikokonjugat ünitelerinde meydana gelen değişikliklerin izlenmesi amaçlanmıştır. Böyle bir çalışmanın yapılması karaciğer toksisitesi oluşturulduktan sonra NAS uygulanan sıçanların karaciğerindeki glikokonjugat ünitelerindeki karbohidrat rezidülerinin ekspresyon ve lokalizasyonunda meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

Karaciğerde CCl₄ ile oluşturulan toksisite modelinde; Galaktoza (EEL), Laktoza (RCA I) ve Mannoza (GNL) spesifik lektinlerin ekspresyon ve lokalizasyonlarına, N Asetil Sisteinin etkisinin olup olmadığı incelenmiştir.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, deney hayvanı olarak 28 adet, 15-17 haftalık, 170-210 gram ağırlığında erkek Sprague-Dawley türü sıçan

kullanıldı. Deney hayvanları 22 ± 2 °C'de, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ortamda, standart kafeslerde, serbest pelet yem ve su alımı sağlanarak barındırıldı. Hayvanlar, çalışma başlamadan 3 hafta önce standart kafeslere konularak ortama alışmaları için bekletildi. Çalışmada, 4 grupta, 7'şer hayvandan oluşan toplam 28 hayvan kullanıldı.

Çalışmanın hayvanlar üzerinde gerçekleştirilebilmesi amacıyla BAÜ-HADYEK'ten gerekli izinler 28.11.2011 tarihinde alınmıştır (Karar No: 2011/12).

Karaciğer toksisitesi oluşturmak amacıyla CCl₄, periton içi (i.p.) 1 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde, birer gün ara ile 3 defa enjekte edildi. Karaciğer toksisitesi oluşturulup N Asetil Sisteinin koruyucu etkisinin belirlenmesi amacıyla CCl₄ i.p. 1 ml/kg 1/1 oranında zeytinyağındaki çözeltisi şeklinde, birer gün ara ile 3 defa enjekte edilip, N Asetil Sistein uygulaması (i.p. 50 mg/kg/gün), CCl₄ enjeksiyonundan 3 gün önce başladı ve deney süresince devam etti. Kontrol gruplarında ise 1 ml/kg zeytinyağı i.p. birer gün ara ile 3 defa enjekte edildi. N Asetil Sistein uygulamasına (i.p. 50 mg/kg/gün) zeytinyağı enjeksiyonundan 3 gün önce başlandı ve deney süresince devam etti.

Hayvanlar, son enjeksiyondan 24 saat sonra eter anestezisine alınarak karaciğer dokuları alındı. Ratlardan alınan karaciğer örnekleri %10'luk formaldehit çözeltisinde, 24 saat tespit edildi. Daha sonra örnekler, distile su ile yıkandı ve alkol serilerinden (%70 %80 %90, %100'lük alkol) geçirilerek dehidrasyonu yapıldı. Parafin gömme ortamına alındı. Parafin gömme ortamındaki bloklardan, mikrotom ile 5 mikron kalınlığında kesitler alındı ve polilizinli lam üzerine konuldu.

Polilizinli lam üzerine alınan kesitler, 70 °C etüvde, 30 dakika tutularak parafini eritildi. Kesitlerdeki parafin artıkları, önce saf ksilolde sonra % 96'lık alkolde, 30'ar dakika bekletilip uzaklaştırıldı. Deneylerde, fosfat tamponu (Phosphate-Buffer Saline, PBS) (pH: 7.4) hem solüsyonların hazırlanmasında, hem de boyama işlemi sırasında, kesitlerin yıkanmasında kullanıldı.

Kesitler ilk olarak, endojen peroksidazların bloke edilmesi için H₂O₂'de (hidrojen peroksit) 10 dakika bekletildi. Uygun konsantrasyonlarda (1:200 oranında) hazırlanan lektin (EEL, GNL, RCA 1) solüsyonlarında kesitler, 1 saat bekletildi. Kesitler, PBS ile 30 dakikada (10 dakika aralıklarla) 3 kez yıkandı. Avidin-Biotin-Peroksidaz enzim kompleksi ile kesitler, 45 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kesitler, 10 dakika aralarla, PBS ile 3 kez yıkandı (30 dakika). Sonra hazırlanmış Diaminobenzidin'de (DAB) kesitler, 5 dakika inkübe edildi. Daha sonra kesitler, Hematoksilin'de 5 sn bekletilerek zıt boyandı ve yıkandı. Boyanmış kesitler ışık mikroskopunda incelendi.

Euonymus Europaeus Lectin (EEL), tip 1 ya da tip 2 zincir kan grubu B yapılarına doğru bir karbohidrat bağlanma özgülüğüne sahiptir ama galaktosil (α-1,3) galaktoz içeren diğer oligosakkaritleri de bağlar.

Galanthus Nivalis Lectin (GNL), kardelen soğanlarından izole edilmiştir (Van Damme ve ark. 1987). Galanthus nivalis lektin, karbohidrat içermeyen 12.5 kDa alt üniteden oluşan tetramerik bir proteindir (Van Damme ve Peunians 1988).

Ricinus communis agglutinin I (RCA I), hintyağı bitkisinin (*R. communis*) tohumlarından üretilen bir glikoproteindir. Yaklaşık 120 kDa bir molekül ağırlığına sahip olan bu lektin, A tipi ve B tipi olarak iki zincirden oluşan bir tetramerdir (Baenziger ve Fiete 1979; Liener ve ark. 1986).

BULGULAR

Deneyisel karaciğer intoksikasyonunda, N Asetil Sisteinin karaciğerdeki bazı lektinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonu üzerine etkileri histokimyasal olarak semikantitatif değerlendirme yöntemi ile belirlenmiştir.

Şekillerde 1, 2 ve 3'de görüldüğü üzere; EEL, GNL ve RCA I için reaksiyonlar, sentralobüler damar ve karaciğer dokusunun sinüsoidal kapillerlerinde gözlemlendi. Hepatositlerde boyanma tespit edilmedi. Semikantitatif olarak yapılan değerlendirmelerde kontrollerde daha hafif boyanma gözlemlenirken, karbon tetraklorürün boyama yoğunluğunu arttırdığı belirlendi. N Asetil Sistein uygulaması, boyanma yoğunluğunun azalmasına neden oldu. 220µ (10x)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Yapılan çalışmada, deneysel karaciğer intoksikasyonunda, N Asetil Sisteinin karaciğerdeki bazı lektinlerin ekspresyonu ve lokalizasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Karbon tetraklorürün lektinlerin ekspresyonu, boyama yoğunluğunu arttırdığı, NAS uygulamasının ise boyama yoğunluğunun azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir. Hücrelerin, CCl₄'e bağlı karaciğer hasarından kendilerini korumak için kendi oligosakkarit ünitelerini artırdığı görülmüştür.

NAS'ın, sıçanların hepatik hücrelerinde CCl₄ ile oluşturulan hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri olduğu gözlemlenmiştir.

Tüm zehirli maddelerin detoksifikasyonu, karaciğerde yer alır. Bu nedenle karaciğer, CCl₄ gibi zararlı kimyasal maddelerin ortadan kaldırılması için merkezi bir organdır. Histopatolojik incelemeler, CCl₄'ün akut ve kronik karaciğer hasarına neden olduğunu ortaya koymuştur (Rojkind 1973; Handa ve Sharma 1990).

N Asetil Sistein, kolayca hücelere girebilen bir antioksidan olarak *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. NAS, GSH düzeylerini artırarak karaciğer hücrelerini korur (Howard ve ark. 1987). Daha önce yapılan çalışmalarda da CCl₄'ün verdiği zararlara karşı, NAS'ın karaciğer hücrelerini koruduğu belirlenmiştir (Kelly 1998). Çalışmada elde edilen bulgular ile yapılan çalışma sonuçları uyumludur

Kurşunlu (2011) tarafından yapılan bir çalışmada; galaktoz ünitelerine spesifik EEL lektin ile yapılan boyamalarda, hem kontrol grubundaki, hem de deney grubundaki hayvanların bağ dokusunda bulunan bazı hücrelerin, tek tük reaksiyon verdikleri belirtilmiştir. Reaksiyonların şiddetinin her iki grupta da çok hafif olduğu bildirilmiştir. Araştırmacı, galaktoz ünitelerinin dişeti dokusundaki miktarı ve lokalizasyonu ile kan glikoz konsantrasyonu arasında bir ilişkinin bulunmadığını belirtmiştir.

Akşit ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada; CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarındaki oksidatif zararını ortadan, NAS'ın oksidan strese karşı dokuların savunmasını destekleyebileceği ayrıca oksijen radikallerini uzaklaştırarak reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerinden korumada yararlı olabileceği, GSH ve GSH ile ilişkili enzimlerin aktivitesinde artışa neden olabileceği ve direkt antioksidan etki gösterebileceği bildirilmiştir. Bu bağlamda, tespit edilen veriler ışığında, NAS uygulamasının, antioksidan metabolizmayı destekleyerek karaciğer hasarlı olgularda hasarın rejenerasyonu sürecinde olumlu etkiler yapabileceği belirtilmiştir.

Zaccone ve ark. (1987) yaptıkları bir çalışmada; *Ambistoma tirinum* larvalarının epidermis hücrelerini, çeşitli lektinlerle

boyamışlardır. Epidermis hücrelerinin apikal zarlarına lektinlerin kuvvetli bağlandığı, lateral ve bazal yüzeylerine ise sadece *Ricinus communis* Agglutinin (RCA I) lektininin kuvvetli bağlandığını belirtmişlerdir. Hücre yüzey polaritesine bağlı olarak hücrelerin apikal yüzeylerinde nötral kompleks karbohidratların, lateral ve bazal yüzeylerinde ise asidik karbohidratların bulunduğunu bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada ise karaciğer sirozu oluşturulmuş ve lektinlerin kuvvetli bağlandığı NAS'ın ise bu bağlanmayı azalttığı belirlenmiştir.

Setshedi ve ark. (2011) yaptıkları bir hayvan deneyinde; etanol ile birlikte NAS verilmesinin, karaciğerde inflamasyonu azalttığını, steatozu mikroveziküler formdan makroveziküler forma doğru değiştirdiğini, proinflamatuvar sitokin gen ekspresyonunu azalttığını ve IGF-1 ve IGF-2 düzeyini artırdığını göstermişlerdir. Araştırma bulgularımızda da NAS verilmesinin karaciğerde lektinlerin ekspresyonunu azalttığı belirlenmiş olup uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Hormia ve Virtanen (1989); WGA, RCA₁₂₀'yi de içeren 14 farklı lektin ile insan gingiva dokusu üzerine yaptıkları bir çalışmada, bu lektinlerin bağlanması ile ilgili yapılan çalışmada elde edilen sonuçlarla paralel bulgular ortaya koymuşlardır. Dişeti bağ dokusunun RCA, WGA lektinleri ile bağlandığını bildirmişlerdir.

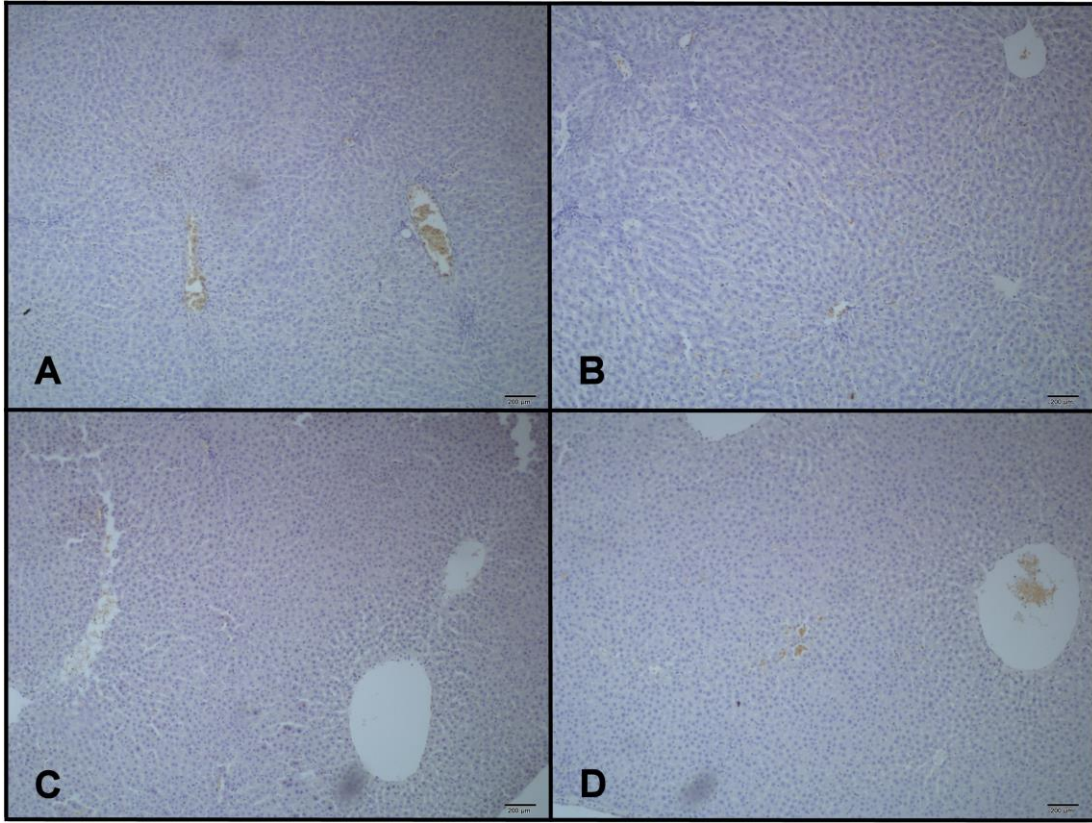
Bampton ve ark. (1991) yaptıkları bir çalışmada; 15 farklı lektin kullanarak sulkular epitelyum, gingival epitelyum, bağ dokusu ve bazal membran ile olan bağlanma ilişkileri hakkında araştırma yapmışlardır. N-Asetil Glikozamin'e spesifik WGA'nın gingival, sulkular ve bağ dokusu epitelyumunda pozitif olduğunu, bazal membranda ise negatif olduğunu bildirmişlerdir.

Even ve Pusztai (1999) tarafından yapılan bir çalışmada; sıçan bağırsak epitelinde GNL üzerine çalışılmıştır. Mannoza spesifik GNL, jejunum ve ileumda pozitif aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Mayanski ve ark. (1993) yaptıkları bir çalışmada; CCl₄ bağlı karaciğer sirozu olan sıçanlarda kan temizlenme oranında 2 kat azalma ve kolloidal karbon parçacıklarını alan Kupffer hücrelerinin sayısında da 4 kat bir azalma olduğunu gözlemlenmişlerdir. Zimosan uyarımının, CCl₄ sirotik karaciğerdeki granülom benzeri yapılara yol açmadığı, sirotik sıçanlarda kontrollerden farklı olarak, karaciğer dokusunun katepsin D etkinliğinin zimosan muamele ile çok az arttığını ve kolajenolitik aktivitede herhangi bir artışın hemen hemen hiç olmadığını belirtmişlerdir.

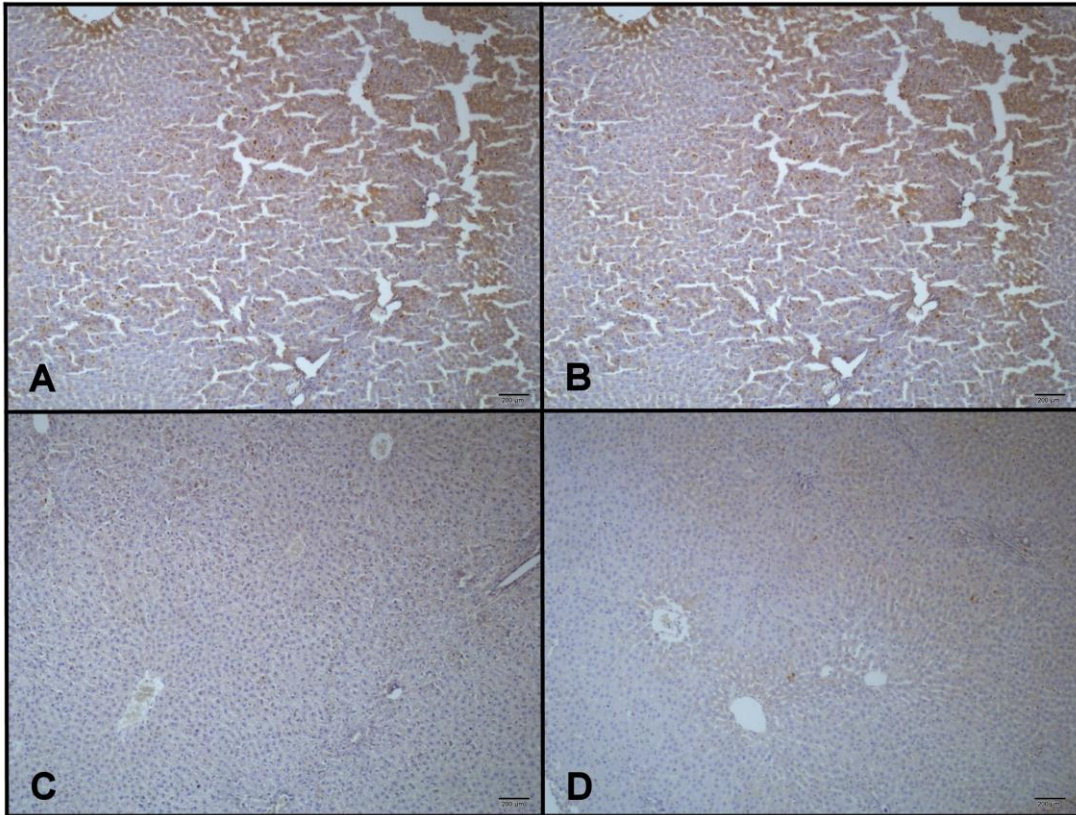
Bacigalupo ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada; galektinlerin (Galektin1, 3, 4, 8, 9) kronik inflamasyon ve fibrozis ile ilişkili diğer karaciğer patolojilerinde kilit rol oynadığını belirtmişlerdir. Bu alandaki araştırmaların yeni başlamış olmasına rağmen, hepatosellüler karsinom (HCC) biyolojisinde hayvan modellerinden ve insan örneklerinden biriken kanıtların geniş bir yelpazesıyla galektinlerin rolünü doğrulamışlardır. Yapılan çalışmamızda ise karaciğer patolojisinde lektinlerin ekspresyonunda artış tespit edilmesi araştırmacıların sonuçlarını desteklemektedir.

Lektinlerle ilgili yapılan çok fazla sayıda çalışma olmasına rağmen N Asetil Sistein, sıçan karaciğerleri ve lektinler arasındaki ilişkiler hakkında ve karaciğer sirozu ile Galaktoza spesifik EEL, Mannoza spesifik GNL ve Laktoza spesifik RCA I lektinler arasındaki ilişkiye dair yapılan çalışmalar, yok denecek kadar azdır.



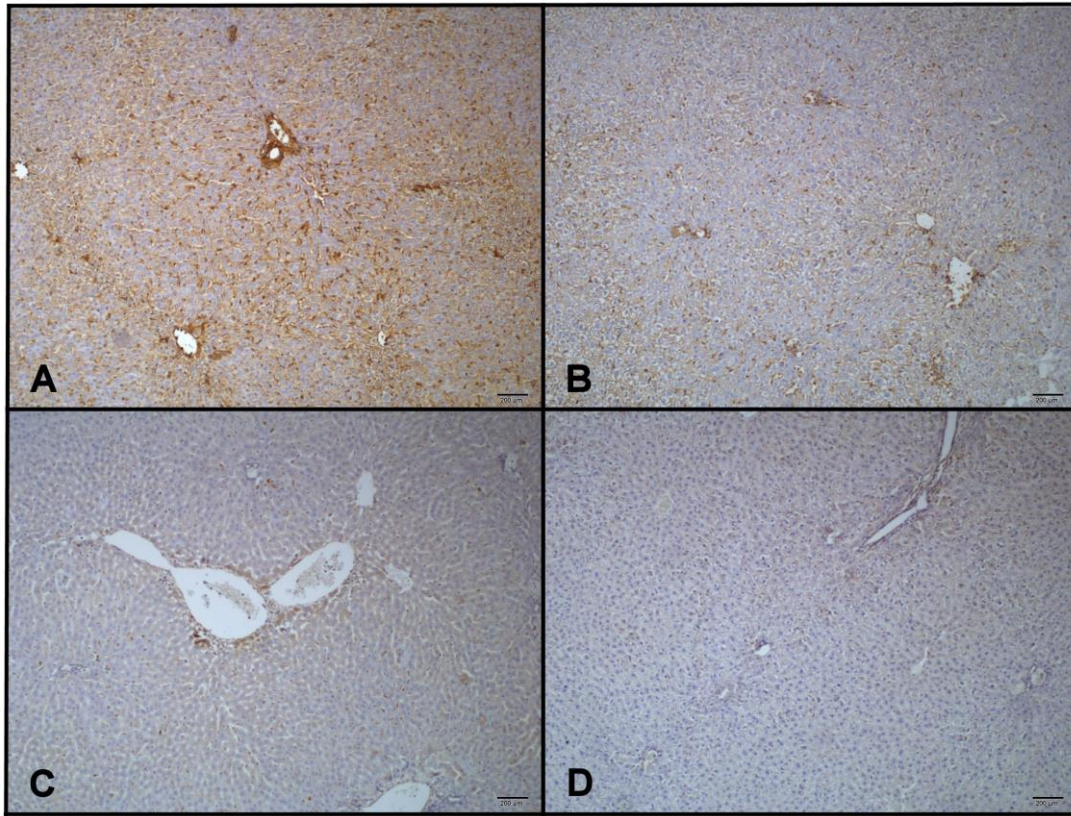
Şekil 1. A) CCl₄ uygulanan grupta EEL bağlanma bölgeleri; B) CCl₄ + NAS uygulanan grupta EEL bağlanma bölgeleri; C) Kontrol (Zeytinyağı) grubunda EEL bağlanma bölgeleri; D) Kontrol (Zeytinyağı + NAS) grubunda EEL bağlanma bölgeleri.

Figure 1. A) The binding sites of EEL in CCl₄ treated group; B) The binding sites of EEL in CCl₄ + NAC treated group; C) The binding sites of EEL in Control (Olive oil) group; D) The binding sites of EEL in Control (Olive oil + NAC) group.



Şekil 2. A) CCl₄ uygulanan grupta GNL bağlanma bölgeleri; B) CCl₄ + NAS uygulanan grupta GNL bağlanma bölgeleri; C) Kontrol (Zeytinyağı) grubunda GNL bağlanma bölgeleri; D) Kontrol (Zeytinyağı + NAS) grubunda GNL bağlanma bölgeleri.

Figure 2. A) The binding sites of GNL in CCl₄ treated group; B) The binding sites of GNL in CCl₄ + NAC treated group; C) The binding sites of GNL in Control (Olive oil) group; D) The binding sites of GNL in Control (Olive oil + NAC) group.



Şekil 3. A) CCl₄ uygulanan grupta RCA I bağlanma bölgeleri; B) CCl₄ + NAS uygulanan grupta RCA I bağlanma bölgeleri; C) Kontrol (Zeytinyağı) grubunda RCA I bağlanma bölgeleri; D) Kontrol (Zeytinyağı + NAS) grubunda RCA I bağlanma bölgeleri.

Figure 3. A) The binding sites of RCA I in CCl₄ treated group; B) The binding sites of RCA I in CCl₄ + NAC treated group; C) The binding sites of RCA I in Control (Olive oil) group; D) The binding sites of RCA I in Control (Olive oil + NAS) group.

Hücrelerin, CCl₄'e bağlı karaciğer hasarından kendilerini korumak için kendi oligosakkarit ünitelerini artırdığı görüldü. NAS'ın, sıçanların hepatic hücrelerinde CCl₄ ile oluşturulan hasara karşı koruyucu ve tedavi edici etkileri olduğu, CCl₄'ün oluşturduğu karaciğer patolojisine bağlı olarak lektinlerin ekspresyonunu artırdığı, NAS'in ise bunu azalttığı gözlemlendi.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Balıkesir Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014 /152 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akşit H, Akşit D, Bildik A, Kara H, Yavuz Ö, Seyrek K (2015).** Deneysel karaciğer intoksikasyonunda N-Asetil Sistein'in glutatyon metabolizması ve lipid peroksidasyonuna etkileri. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 62, 1-5.
- Bacigalupo ML, Manzi M, Rabinovich GA, Troncoso MF (2013).** Hierarchical and selective roles of galectins in hepatocarcinogenesis, liver fibrosis and inflammation of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterology*, 19 (47), 8831-8849.
- Baenziger JU, Fiete D (1979).** Structural determinants of Ricinus communis agglutinin and toxin specificity for oligosaccharides. *J Biol Chem*, 254, 9795-9799.
- Bampton JLM, Shirlaw PJ, Topley S, Weller P, Wilton JM (1991).** Human junctional epithelium: Demonstration of a new marker, its growth *in vitro* and characterization by lectin reactivity and keratin expression. *J Invest Dermatol*, 96, 708-717.
- Basu D, Nair JV, Appukuttan PS (1987).** Oligosaccharide structure determination of glycoconjugates using lectins. *J Biosci*, 11(1-4), 41-46.
- Bulgakow AA, Park KI, Choi KS, Lim HK, Cho M (2004).** Purification and characterisation of a lectin isolated from the manila clam *Ruditapes philippinarum* in korea. *Fish Shellfish Immun*, 16, 487-499.

- Even SWB, Pusztai A (1999).** Effect of diets containing genetically modified potatoes expressing Galanthus Nivalis Lectin on rat small intestine. *Lancet*, 9187, 1353-1354.
- Franz H (1986).** Mistletoe lectins and their a and b chains. *Oncology*, (43), 23-34.
- George S, Oh Y, Lindblom S, Vilain S, Rosa AJM, Francis DH, Brözel VS, Kaushik RS (2007).** Lectin binding profile of the small intestine of five-week old pigs in response to the use of chlortetracycline as a growth promotant and under gnotobiotic conditions. *J Anim Sci*, 85, 1640-1650.
- Handa SS, Sharma A (1990).** Hepatoprotective activity of andrographolide from *Andrographis paniculata* against carbontetrachloride. *Indian J Med Res*, 92, 276-283.
- Harrison FL (1991).** Soluble vertebrate lectins: Ubiquitous but inscrutable proteins. *J Cell Sci*, 100, 9-14.
- Hormia M, Virtanen I (1989).** Saccharide residues in human gingiva as revealed with fluorochrome-coupled lectins. *J Periodont Res*, 2, 137-145.
- Howard RJMW, Blake DR, Pall H, Williams A, Green ID (1987).** Allopurinol/N-Acetylcysteine for carbon monoxide poisoning. *Lancet*, 2, 628-629.
- Kayalı H (1992).** Özel Histoloji. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye.
- Kelly GS (1998).** Clinical applications of N-Acetylcysteine. *Altern Med Rev*, 3, 114-127.
- Kilpatrick DC (2002).** Animal lectins: A historical introduction and overview. *Biochim Biophys Acta*, (2-3), 187-197.
- Kurşunlu SF (2011).** Deneysel diyabet oluşturulan ratlarda dişeti dokusunun ekstrasellüler matriks ve hücre yüzeyinde bulunan glikokonjugatların yapısı ve lokalizasyonunun incelenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora tezi, Aydın, Adnan Menderes Üniversitesi.
- Kus I, Oğurturk M, Oner H, Sahin S, Yekeler H, Sarsılmaz M (2005).** Protective effects of melatonin against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats: A light microscopic and biochemical study. *Cell Biochem Funct*, 3, 169-174.
- Liener I, Sharon N, Goldstein IJ (1986).** The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine, San Diego, Academic Press Inc.

- Lis H, Sharon N (1986).** Lectins as molecules and as tools. *Ann Rev Biochem*, 55, 35-67.
- Mayanski DN, Schwartz YSH, Kutina SN, Zubakhin AA, Mayanskaya NN, Tsyrendorjiev DD (1993).** Mononuclear phagocyte system responsiveness in CCl₄-induced liver cirrhosis. *Int J Exp Pathol*, 74 (3), 229-236.
- Murnane RD, Ahern-Rindell AJ, Prieur DJ (1989).** Lectin histochemistry of an ovine lysosomal storage disease with deficiencies of β -Galactosidase and α -Neuraminidase. *Am J Pathol*, 4, 135.
- Qua CS, Goh KL (2011).** Liver cirrhosis in Malaysia: Peculiar epidemiology in a multiracial Asian country. *J Gastroenterol Hepatol*, 26, 1333-1337.
- Rojkind M (1973).** Inhibition of liver fibrosis by-L Azetidine-2-carboxylic acid in rats treated with carbon tetrachloride. *J Clin Invest*, 52, 2451-2456.
- Scillitani GS, Zizza GE, Liquori GE, Ferri D (2007).** Lectin histochemistry of gastrointestinal glycoconjugates in the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *Acta Histochem*, 109, 347-357.
- Sener G, Tosun O, Sehirli AO, Kacmaz A, Arbak S, Ersoy Y (2003).** Melatonin and N-Acetylcysteine have beneficial effects during hepatic ischemia and reperfusion. *Life Sci*, 72, 2707-2718.
- Setshedi M, Longato L, Petersen DR, Ronis M, Chen WC, Wands JR, de la Monte SM (2011).** Limited therapeutic effect of N-acetylcysteine on hepatic insulin resistance in an experimental model of alcohol-induced steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res*, 35 (12), 2139-2151.
- Van Damme EJM, Allen AK, Peumans WJ (1987).** Isolation and characterization of a lectin with exclusive specificity towards mannose from snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulbs. *FEBS Lett*, 215, 140-144.
- Van Damme EJM, Peunians WJ (1988).** Related mannose-specific lectins from different species of the family *Amaryllidaceae*. *Plant Physiol Plant*, 73, 52-57.
- Wieser R, Brunner G (1982).** Interaktions- und Regulationsmechanismen der Zelle: Membranlektine- Membran glykomoleküle Biologie in unserer Zeit. 12, 97-107.
- Zaccone G, Fasula S, Locascio P, Licata A, Ainis L, Affronte R (1987).** Lectin binding pattern on the surface epidermis of *Ambystoma tigrinum* larvae. *Histochem*, 87, 431-438.
- Zafarullah M, Li WQ, Sylvester J, Ahmad M (2003).** Molecular mechanisms of N-Acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci*, 60, 6-20.



Serologic and Molecular Investigation of Q Fever on Water Buffalo in Afyon

Elcin GUNAYDIN¹ Selcuk PEKKAYA²

¹ Etlik Veterinary Control Central Research Institute, Breeding Disease Diagnosis Laboratory, Ankara, Turkey,

² Etlik Veterinary Control Central Research Institute, Biochemistry Laboratory, Ankara, Turkey

Received: 07.08.2015

Accepted: 11.11.2015

SUMMARY

The water buffalo were usually grown for milk production and famous by-products, semi-hard cheese and especially cream clotting in Afyon. In this study, it was aimed to determine the risk of Q fever infection among the water buffalos, in Afyon. The collected 92 serum and 92 blood samples of female water buffalos were examined to investigate for the different stages of infection. A total of 92 serum samples was examined for the presence of *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) antibodies against phase I and phase II antigens by indirect ELISA. Eight (8.69 %) out of 92 serum samples were found to be antibody positive. Of the examined blood samples, none of them were found to harbor *C. burnetii* DNA.

Key Words: Q Fever, Water buffalo, ELISA, PCR

ÖZET

Afyon İlinde Mandalarda Q Humması'nın Serolojik ve Moleküler Araştırılması

Afyon'da manda, süt ve süt yan ürünlerinden peynir, özellikle de kaymak üretimi amacıyla yetiştirilmektedir. Bu çalışmada, Afyon ilinde mandalarda Q humması riskini araştırmak amaçlanmıştır. Dişi mandalardan toplanan 92 serum ve 92 kan örneği, enfeksiyonun farklı dönemlerini tespit etmek amacıyla incelendi. Toplam 92 serum örneğinde, *Coxiella burnetii* (*C. burnetii*) faz 1 ve faz 2 antijenlerine karşı antikor varlığı indirekt ELISA ile incelendi. Doksaniki örneğin 8'i (%8.69) antikor pozitif bulundu. İncelenen kan örneklerinde *C. burnetii* DNA'sına rastlanmadı.

Anahtar Kelimeler: Q Humması, Manda, ELISA, PCR

INTRODUCTION

Animals typically acquire *C. burnetii* via exposure to infected animals, by direct contact with parturition products and also by inhalation of infectious aerosols. Domestic farm animals are the major source of Q fever infection. It is known that *C. burnetii* may cause abortion in sheep and goats, but not in cows. Cows are often naturally infected but usually do not show clinical signs. Even if reproductive disorders and mastitis occur, abortion in cows are believed to be rare (To 1998). Due to frequently chronically infected, and not showing clinical signs, persistent shedding of *C. burnetii* via milk is a major problem in cows (Maurin and 1999; Porter *et al.* 2011).

The water buffalo has been raised in Turkey for centuries, originating from Indian migration (7th Century) (Sekerden *et al.* 1996b). Water buffalo husbandry concentrates in the Black Sea Region, North of Middle Anatolia, Thrace, Hatay, Mus, Kars, Diyarbakir, Afyon, Sivas. Buffaloes are raised for milk production only as source of income that does not

require any expenditure, i.e. in the areas that have natural feeding conditions. Frequently, the water buffaloes were reared with the cow herds. The water buffaloes raised for milk production and famous by-products, semi-hard cheese and especially cream clotting, in Afyon (Sekerden *et al.* 1996a; Sekerden *et al.* 1996b). The studies on Q fever for water buffaloes were restricted in the world as well in Turkey (Adesiyun and Cazabon 1996; Perugini *et al.* 2009).

In acute Q fever infections, antibodies against phase II antigens were observed in high rates. In chronic infections, antibody response developed against phase I in addition to phase II antigens due to phase variation of *C. burnetii* (Rodolakis 2006). Investigations on Q fever mostly depend on serological diagnosis (Rousset *et al.* 2011). If the serological tests were compared to determine either acute or chronic stage of the infection, CFT and FAT were declared to have some disadvantages. ELISA is advantageous due to capable of detecting both anti-phase I and anti-phase II antibodies compared to FAT. And also, ELISA is superior than CFT because of high sensitivity for determining all IgG

subclasses (Rousset *et al.* 2011). Serological response occurs in earliest 7-15 days. For a definitive diagnosis of early stages of acute Q fever, serological testing in combination with PCR was recommended (Vaidya *et al.* 2010).

In this study, it was aimed to investigate the different stages of the infection (acute and chronic) in water buffaloes, in Afyon. In order to investigate the presence of antibodies against *C. burnetii*, serum samples were examined by Indirect ELISA. Blood samples were checked for the presence of *C. burnetii* by touch-down PCR.

MATERIALS and METHODS

Samples: In 2011, total 92 serum and 92 blood samples of water buffalo were collected from the province of Afyon, Turkey. In Afyon, traditional buffalo breeding was done by the families, eg. three to five buffaloes owned by the family. All the water buffaloes were selected randomly and none of them has a recorded abortion history or reproductive disorder. All the blood samples were taken from the water buffaloes reared by the families which were sent to slaughterhouse. Blood samples collected in EDTA anticoagulant blood tubes for DNA extraction and serum tubes for serological examination. All the sera were separated 24 hours after sampling. All serum and blood samples were stored at -20 °C until tested.

ELISA: The sera were tested for the presence of specific antibodies directed to both phase I and phase II antigens of *C. burnetii* using ELISA CHECKIT Q-fever test (Idexx Laboratories, Broomfield, CO, USA) according to the manufacturer's instructions.

Positive control: DNA extracted from positive strain containing the gene coding phase II antigen was kindly obtained from Firat University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Microbiology and used as a positive control.

DNA Extraction: Blood samples were extracted by commercial DNA isolation kit (QIAamp DNA Mini Kit; Qiagen, Cat no:51104) according to the manufacturer's instructions. DNAs were stored at -20 °C until used.

Primers: Trans-1(Forward) and Trans-2(Reverse) primers, complementary to the *IS1111* fragment, a transposon-like repetitive region were used for the diagnosis of *C. burnetii* by touchdown PCR. Primers as previously described by Hoover *et al.* (1992) consisted of the following sequences: Trans-1 (Forward); 5'-TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C-3' and Trans-2 (Reverse); 5'-CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC-3'. Expected amplicon size was 687 bp.

Touchdown PCR: Each reaction had a volume of 25 µl including, 22 µl reaction mixture containing 2.5 µl 10 X PCR buffer (without MgCl₂), 0.5 µl dNTP (10 mM), 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), a 1 µl of each primer (10 pmol/µl), 0.25 µl Taq DNA polymerase (5 U/µl) (Fermantas; EP 402), 15.25 µl deionized water and 3 µl template. Cycling parameters were as follows: initial denaturation at 95 °C for 2 min followed by 5 cycles of denaturation at 94 °C for 30 sec, 66 to 61 °C (the temperature was decreased by 1 °C between consecutive steps) for 1 min, extension 72 °C for 1 min and final extension 72 °C for 10 min (Berri *et al.* 2000). Touchdown PCR was performed using Thermal Cycler (Arktik, ThermoScientific).

Agarose Gel Electrophoresis: PCR products were electrophoresed on a 1.5 % agarose gel in TBE buffer containing 0.5µg/µl of ethidium bromide at 100 V for 45 min and visualized under UV light.

RESULTS

In this study, 92 serum and 92 blood samples of female water buffaloes collected from the province of Afyon, were examined. A total of 92 serum samples was examined for the presence of *C. burnetii* antibodies against phase I and phase II antigens by indirect ELISA. Eight (8.69 %) out of 92 serum samples were found to be antibody positive. Of the examined blood samples, none of them were found to harbor *C. burnetii* DNA.

DISCUSSION

The epidemiology of Q-fever in water buffalo (*Bubalus bubalis*) is largely unknown worldwide. There is limited Q fever studies carried out on water buffalo in the world. The prevalence of Q fever on water buffaloes was ranged from 0% to 16.66% (Adesiyun and Cazabon 1996; Galiero *et al.* 1996; Kalema-Zikusoka *et al.* 2005; Perugini *et al.* 2009; Vaidya *et al.* 2010). In a study conducted on 164 aborted Italian water buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses, 17.5% infection prevalence was declared to be determined by one-tube nested PCR with a highest infection rate in placenta, followed by liver and spleen (Perugini *et al.* 2009). Galiero *et al.* (1996) reported that 1.2% positivity was found of the examined 1012 serum samples. The prevalence of antibodies to *C. burnetii* of the examined sera of 1011 buffaloes in India was announced to be 16.02% by Yadav *et al.* (1979). Vaidya *et al.* (2010) declared the prevalence of Q fever in buffaloes as 16.66% in Italy. In 1997, in a study conducted in Uganda on 42 free-ranging African buffaloes, none of the buffaloes was found to be *C. burnetii* positive (Kalema-Zikusoka *et al.* 2005).

In Turkey, a few regional studies investigating seroprevalence of Q fever in human, sheep, cattle, and goat were implemented (Cetinkaya *et al.* 2000; Gozalan *et al.* 2005; Kilic *et al.* 2005; Dogru *et al.* 2010; Kennerman *et al.* 2010; Gazyagci *et al.* 2011; Arserim *et al.* 2011; Ozturk *et al.* 2012). And also, PCR-based diagnostic methods were used to investigate Q fever such as in blood, aborted fetuses, milk of goat, sheep, cattle (Ongor *et al.* 2004; Kirkan *et al.* 2008; Gunaydin *et al.* 2014; Gunaydin *et al.* 2015). To our knowledge, there is hardly any study conducted on water buffalo on the subject of Q fever in Turkey. In 1952, in Ankara, the results of WHO survey showed that 2 out of 49 buffaloes were *C. burnetii* positive (Kaplan and Bertagna, 1955). Although we encountered only one study conducted on Q fever on water buffalo, in the neighbour provinces which Afyon has a border such as Konya, Burdur, Eskisehir were proven to be positive for the presence of Q fever among the tested cattle, sheep (Kilic *et al.* 2005, Gazyagci *et al.* 2011, Ozturk *et al.* 2012, Gunaydin *et al.* 2015). In addition to resistance of *C. burnetii* spores to environmental conditions, Afyon localized on a risky geographical location and the continental climatic features of Afyon, contributes the dispersion of aerosols in the province (Nakuene *et al.* 2004).

Eight (8.69%) positive ELISA titers and negative PCR results showed us that the antibody positive water buffaloes were in the chronic stage of the infection. The fact that the positive sera were not tested by FAT, we could not discriminate whether the antibodies developed against phase I or phase II. Persisting high level antibodies were attributed to continuous antigenic stimulation and considered to be indicative for chronic Q fever in humans (Wegdam-Blans *et al.* 2012). However in animals this situation is not well evaluated. From our point of view, the positive antibody titers cannot be attributed to onset of Q

fever infection because blood samples were negative for the presence of *C. burnetii* DNA. As previously declared by Musso and Raoult (1995) blood samples were suitable in the peracute stage of the infection in order to detect *C. burnetii* DNA. Nevertheless, the positive ELISA titers were lead us to think that those water buffaloes might have been infected with *C. burnetii* at any stage of their life as emphasized.

To sum up, the positive ELISA titers led us to think that climatic features of Afyon and Q fever prevalence of the neighbour provinces prone to water buffaloes to Q fever in Afyon. However, more extensive prevalence studies need to be carried out to define the role of buffaloes as reservoirs for this pathogen and also the role of *C. burnetii* as an abortive agent in this animal. Animal breeders should be informed to take hygienic measures in order to restrict the probable infection.

CONCLUSION

Seropositivity in water buffaloes had a ratio that should not be ignored. Q fever positivity in neighbour provinces which has a border to Afyon and both geographical and climatic characteristics of Afyon prone the water buffaloes to Q fever. Therefore, more detailed investigations should be carried out on water buffaloes.

REFERENCES

- Adesiyun AA, Cazabon EPI (1996). Seroprevalence of brucellosis, Q-fever and toxoplasmosis in slaughter livestock in Trinidad. *Rev d'Elev et de Med Vet Pays Trop*, 49, 28-30.
- Arserim NB, Yesilmen S, Tel OY, Ozakinci T, Keskin O, Pulat H, Vural A (2011). Seroprevalence of Coxiellosis in cows, sheep, goats and humans in Diyarbakir region of Turkey. *Afr J Microbiol Res* 5, 2041- 2043.
- Berri M, Laroucau K, Rodolakis A (2000). The detection of *Coxiella burnetii* from ovine genital swabs, milk and fecal samples by the use of a single touchdown polymerase chain reaction. *Vet Microbiol* 72, 285-293.
- Cetinkaya B, Kalender H, Ertas HB, Muz A, Arslan N, Ongor H, Gurçay M (2000). Seroprevalence of coxiellosis in cattle, sheep and people in the east of Turkey. *Vet Rec*, 146, 131-136.
- Dogru Kasimoglu A, Yildirim M, Unal N, Gazyagci S (2010). The Relationship of *Coxiella burnetii* seropositivity between farm animals and their owners: A pilot study. *JAVA*, 9, 1625-1629.
- Galiero G, Goffredi CG, D'Orazi A (1996). Epidemiologia della Febbre Q: sieroprevalenza negli allevamenti bufalini della provincia di Salerno. *La Selezione Veterinaria*, 6,407-411.
- Gazyagci S, Aktas MS, Kilic S, Babur C, Celebi B, Duru SY (2011). Seroprevalence of Q fever in dairy cattle in the Konya province, Turkey. *Revue Méd Vét*, 162, 387-390.
- Gozalan A, Esen B, Rolain JM, Akin L, Raoult D (2005). Is Q fever an emerging infection in Turkey? *East Mediterr Health J*, 11, 384-391.
- Gunaydin E, Pekmaya S, Mustak HK, Dalkılıç B (2014). Investigation of Q Fever in Kilis and Shamil goats by ELISA and Touchdown-PCR. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 61, 161-165.
- Gunaydin E, Mustak HK, Sareyyupoglu B, Ata Z (2015). PCR detection of *Coxiella burnetii* in fetal abomasal contents of ruminants. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(1), 69-73.
- Hoover TA, Vodkin MH, Williams JC (1992). A *Coxiella burnetii* repeated DNA element resembling a bacterial insertion sequence. *J Bacteriol*, 174, 5540-5548.
- Kalema-Zikusoka G, Bengis RG, Michel AL, Woodford MH (2005). A preliminary investigation of tuberculosis and other diseases in African buffalo (*Syncerus caffer*) in Queen Elizabeth National Park, Uganda. *Onderstepoort J Vet Res*, 72(2), 145-51.
- Kaplan MM and Bertagna P (1955). The Geographical Distribution of Q Fever. *Bull Org mond Sante Bull Wild Hlth Org*, 13, 829-860.
- Kennerman E, Rousset E, Golcu E, Dufour P (2010). Seroprevalence of Q fever (coxiellosis) in sheep from the Southern Marmara Region, Turkey. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 37-45.
- Kilic S, Pasa S, Babur C, Ozlem MB (2005). Investigation of *Coxiella burnetii* antibodies in sheep in Aydin region, Turkey. *Revue Méd Vét*, 156, 336-340.
- Kirkan S, Kaya O, Tekbiyik S, Parin U (2008). Detection of *Coxiella burnetii* in cattle by PCR. *Turk J Vet Anim Sci*, 32, 215-220.
- Maurin M and Raoult D (1999). Q fever. *Clin Microbiol Rev*, 12, 518-553.
- Musso D and Raoult D (1995). *Coxiella burnetii* blood cultures from acute and chronic Q-fever patients. *J Clin Microbiol*, 33, 3129-3132.
- Nakoune E, Debaere O, Koumanda-Kotogne F, Selekon B, Samory F, Talarmin A (2004). Serological surveillance of brucellosis and Q fever in cattle in the Central African Republic. *Acta Trop*, 92, 147-151.
- Ongor H, Cetinkaya B, Karahan M, Açık MN, Bulut H, Muz A (2004). Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Vet Rec*, 154, 570-572.
- Ozturk D, Kale M, Pehlivanoglu F, Hasiroglu S, Turutoglu H (2012). Evaluation for some bacterial and viral abortions of dairy cattle farms in Burdur District of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18 (2), 255-258.
- Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G (2009). Detection of *Coxiella burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report. *Res Vet Sci*, 87, 189-191.
- Porter RS, Czaplicki G, Mainil J, Guatteo R and Saegerman C (2011). Q Fever: Current state of knowledge and perspectives of research of a neglected zoonosis. *Int J Microbiol*, 248418: 1-22.
- Rodolakis A (2006). Q fever, state of art: epidemiology, diagnosis and prophylaxis. *Small Ruminant Res*, 62, 121- 124.
- Rousset E, Berri M, Durand B, Dufour P, Prigent MYR, Delcroix T, Touratier A, Rodolakis A (2009). *Coxiella burnetii* shedding routes and antibody response after outbreaks of q fever-induced abortion in dairy goat herds. *Appl Environ Microbiol*, 75, 428-433.
- Sekerden O, Kebapci M, Kopar A (1996a). Buffalo population and production in Turkey. *Buffalo Newsletter*, 5, 7-8.
- Sekerden O, Kebapci M, Kopar A (1996b). Blood transferrin types and genetic structure for transferrin types of buffalo population in Samsun province. *Buffalo Newsletter*, 5, 11-12.
- To H (1998). Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in dairy cattle with reproductive disorders. *J Vet Med Sci*, 60, 859-861.
- Vaidya VM, Malik SVS, Kaur S, Kumar S, Barbudde SB (2008). Comparison of PCR, immunofluorescence assay, and pathogen isolation for diagnosis of Q fever in humans with spontaneous abortions. *J Clin Microbiol*, 46, 2038-2044.
- Vaidya VM, Malik SV, Bhilegaonkar KN, Rathore RS, Kaur S, Barbudde SB (2010). Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 33, 307-321.
- Wegdam-Blans MCA, Ter Woorst JF, Klompenhouwer EG, Teijink JA (2012). David procedure during a reoperation for ongoing chronic Q fever infection of an ascending aortic prosthesis. *Eur J Cardiothorac Surg*, 1-2: doi:10.1093/ejcts/ezs217.
- Yadav MP, Sethi MS (1979). Sero-epidemiological studies on coxiellosis in animals and man in the state of Uttar Pradesh and Delhi (India). *Int J Zoonoses*, 6(2), 67-74.





A Study on the Anatomic and Histological Structures of Magpie (*Pica pica*) Glandula Uropygialis

Hulya BALKAYA Dervis OZDEMIR Zekeriya OZUDOGRU Hulya KARA Emre ERBAS

Ataturk University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, Erzurum, Turkey

Received: 21.01.2016

Accepted: 23.02.2016

SUMMARY

The study aims to investigate anatomical, histological and morphometric structures of the magpie's (*Pica pica*) glandula uropygialis living in Turkey. Magpies were anesthetized and common carotid artery was cut for blood draining. Then abdominal organs were removed and fixed in the 10% formaldehyde solution and glandula uropygialis was dissected. Then, glandula uropygialis tissues passed alcohol and xylene series and embedded in paraffin blocks for histological analyses. The blocks were cut and obtained 7 µm thickness of section were stained with Crossman Modified Triple staining. Magpie (*Pica pica*)'s glandula uropygialis located on 3 and 4. caudal vertebra and pygostyl under the integument and it was observed that consisted of bilateral two lobes as right and left. In histological analyses, there were holocrine glands covered by connective tissues and these glands opened a same duct in the papilla. It was determined that glandula uropygialis is a simple tubular holocrine gland and this gland covered by connective tissues.

Key Words: Anatomy, Glandula uropygialis, Histology, Magpie (*Pica pica*)

ÖZET

Saksağanda (*Pica pica*) Glandula Uropygialis'in Anatomik ve Histolojik Yapıları Üzerine Bir Çalışma

Bu çalışma, Türkiye'de yaşayan saksağan (*Pica pica*) türü kuşlarda, glandula uropygialis'in anatomik ve histolojik yapıları ile morfometrik özelliklerinin ortaya konması amacıyla yapılmıştır. Saksağanların, derin anestezi altında a. carotis communis'i kesilerek vücut kanları boşaltıldı. Karın boşluğundaki organları dışarı alınan materyaller %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildikten sonra glandula uropygialis'leri diseke edildi. Daha sonra histolojik analizler için alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafin bloklara gömüldü ve 7 µm kalınlığında seri kesitler alınarak Crosman Modifiye Triple boya ile boyanarak incelendi. Glandula uropygialis'in saksağanda 3 ve 4. caudal vertebra ve pygostyl üzerinde, derinin hemen altında yer aldığı ve bilateral olarak sağ ve sol iki lobdan oluştuğu gözlemlendi. Histolojik incelemelerde, bağ dokudan oluşan loblarda holokrin yağ bezlerinin bulunduğu ve bu bezlerin papilla içerisinde yer alan ortak, tek bir aktıvıcı kanala açıldığı belirlendi. Glandula uropygialis'in basit tubuler yapıda holokrin bir bez olduğu ve bu bezleri saran bir bağ dokunun bulunduğu tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Anatomi, Glandula uropygialis, Histoloji, Saksağan (*Pica pica*).

GİRİŞ

Diğer omurgalılarla karşılaştırıldığında, kuşlar çok sayıda özelleşmiş deri bezlerine sahip değillerdir. Özellikle memelilerde çok sayıda gelişmiş ve özelleşmiş deri bezi bulunmaktadır. Kanatlılardaki glandula uropygialis, memelilerde görevi yağ salgısı üretmek olan glandula sebacea'nın analogu olarak bulunan bir deri bezidir (King ve McLelland 1985; Salibian ve Montalti 2009). Bazı papağan ve güvercin türleri ile kuşuda bulunmayan glandula uropygialis, ördek ve muhabbet kuşlarında ise iyi gelişmiştir (Gezici 2002). Türlerle göre bezin büyüklüğü değişiklik göstermekle birlikte, uzun kuluçkaya yatma periyoduna sahip türlerin glandula uropygialis'inin, kısa

kuluçka periyoduna sahip kuş türlerinden önemli ölçüde küçük boyutlara sahip olduğu bildirilmiştir (Vince ve ark. 2013). Bu bez kuşlarda synsacrum'un caudal bölgesinde dorsal ve medial olarak yerleşmiş ve bulunduğu yerde daima makro- anatomik olarak görülebilen bir büyüklüğe sahiptir (Jacob ve Ziswiler 1982; Martin ve ark. 2009; Harem ve ark. 2010). Genellikle iki loblu yapıya sahip olan organın şekli ve büyüklüğü türlere göre değişiklik göstermektedir (Salibian ve Montalti 2009; Stettenheim 2000). Yüzcü kuşlarda 'V' harfi şeklinde, tavuklarda fasulye büyüklüğünde, ördek ve kazda fındık büyüklüğündedir. Bezin her iki lobu bağdokudan bir kapsülle sarılmıştır. İçindeki salgı cisterna'lar vasıtasıyla caudal uçtaki papillaya ileten glandula uropygialis'in

papillasının kuşların gagalarıyla aktive edilmesi neticesinde yağ salgısı tüylerin üzerine yayılır. Bu sayede tüyler üzerinde, sudan ve mikroorganizmalardan koruyan bir tabaka şekillenir (Nickel ve ark. 1977; Gezici 2002). Bezin papillası kuyruğun hemen dorsal'inde yerleşmiştir ve karakteristik meme şekli görünümündedir (King ve McLelland 1985; Stettenheim 2000). Çoğu kanatlı türünde ayrıca papillanın çevresine dizilmiş circulus uropygialis olarak isimlendirilen, yağ salgısının gaga ile dağılmasına yardımcı olan bir tutam tüy de bulunur (Lucas ve Stettenheim 1972; Jacob ve Ziswiler 1982; King ve McLelland 1985; Stettenheim 2000). Papilla uropygialis, ductus glandulae uropygialis adı verilen bir veya iki akıtıcı kanala sahiptir. Her bir kanal porus ductus glandulae uropygialis adı verilen delikle dışarıya açılarak sonlanır (Baumell ve ark. 1993). Histolojik olarak, bezi oluşturan her iki lob merkezi bir lümen çevresinde yerleşim gösteren tubullerden meydana gelmiştir. Bazı kaynaklarda bezi dışardan saran bağdokudan kapsüle yakın olan kısmın yağ bölgesi, lümenine yakın kısmın ise glikojen bölgesi olduğu ve bu iki bölgenin birbirinden kesin sınırlarla ayrılmadığı belirtilmiştir (Önal ve ark. 2013).

Yapılan literatür taramalarında saksığanın glandula uropygialis'i ile ilgili kapsamlı morfolojik bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Sunulan çalışmada, yabancı bir kuş türü olan, Türkiye ve dünyada geniş bir yaşam sahasına sahip saksığanda (*Pica pica*) glandula uropygialis'in makro-anatomik ve histolojik yapıları ile morfometrik özelliklerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Çalışmada, doğada yaralı olarak bulunan ve tedavi edilemeyen 6 adet saksığan kullanıldı (Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Etik Alt Kurulu, 30.12.2015 tarih ve 2015/17 sayılı kararı). Anesteziye alınan kuşların arteria carotis communis'i kesilerek vücut kanları boşaltıldı. Vücut boşluğu açılan materyallerin karın boşluğundaki organları dışarı alınarak materyaller %10'luk formaldehit solüsyonunda 24 saat süreyle tespit edildi. Tespit işleminden sonra, materyallerin glandula uropygialis'leri, üzerindeki tüylerden uzaklaştırılarak diseksiyon işlemi gerçekleştirildi, bezin makro-anatomik görüntüleri kadavra üzerinde elde edilerek değerlendirildi. Ardından çevre dokulara zarar vermeden glandula uropygialis'ler dikkatlice diseke edilerek kadavradan çıkarıldı. Morfometrik ölçümler için, her iki lob median hattan longitudinal olarak birbirinden ayırt edildi. Bu işlemi takiben lobların ayrı ayrı ağırlıkları, longitudinal ve transversal uzunlukları ve dorsoventral yükseklikleri ölçüldü. Her bezde bir adet bulunan papilla uropygialis'in de ayrı ayrı ağırlık, longitudinal ve transversal uzunlukları ile dorsoventral yükseklikleri ölçülerek elde edilen bütün veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Daha sonra histolojik analizler için alkol ve ksilol serilerinden geçirilen materyaller, parafin bloklara gömüldü ve 7 µm kalınlığında seri kesitler alınarak Crosman Modifiye Triple boyama yöntemi ile boyanarak incelendi.

Çalışmada, anatomik ve histolojik verilerin isimlendirilmesinde Nomina Anatomica Avium (Baumel ve ark. 1993) esas alındı.

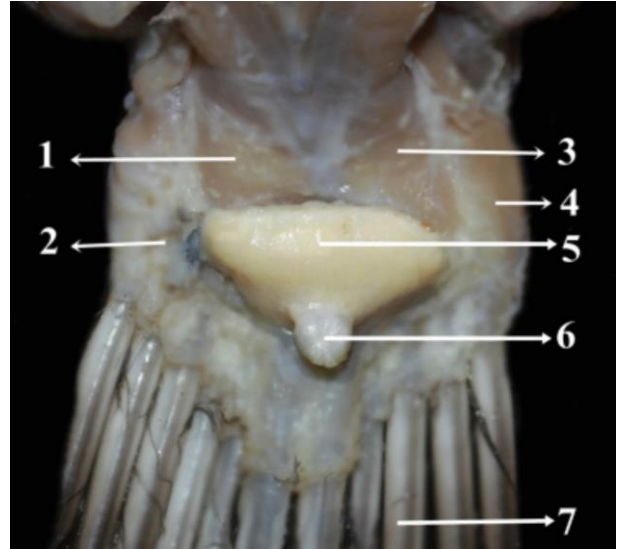
İstatistiksel Analiz

Morfometrik ölçüm değerlerinin istatistiksel analizi Paired T Testi uygulanarak yapıldı. Sonuçlar ortalama ve standart hata olarak ifade edildi.

BULGULAR

Anatomik İnceleme

Glandula uropygialis'in saksığanda 3. ve 4. caudal vertebra ile pygostyl üzerinde, derinin hemen altında subcutan olarak yer aldığı, cranial'den ve lateral'den musculus levator coccygeus ve musculus coccygeus lateralis'le çevrili olduğu belirlendi. Kuyruk kaslarının bezle ilişkisi olmadığı ve kuyruk omurlarına yapıştıkları tespit edildi. Glandula uropygialis'in bilateral olarak sağ ve sol iki lobdan oluştuğu, her iki lobun median hat üzerinde birbirine paralel olarak uzandığı ve aralarında septum interlobare ile belirginleşen longitudinal bir sınırın belirdiği görüldü. Bezin dorsal'den görünümünün oval fasulye tanesi şeklinde olduğu, caudoventral görünümünün ise "V" harfine benzediği belirlendi. Glandula uropygialis'in akıtıcı kanalını içeren papilla uropygialis'in, septum interlobare'nin caudal ucu üzerine yerleştiği ve rectrix'ler (kuyruk teleği) üzerine doğru bir çıkıntı şekillendirdiği tespit edildi. (Şekil 1).



Şekil 1. Saksığan'da glandula uropygialis'in makro-anatomik görüntüsü

Figure 1. Macro-Anatomic view of glandula uropygialis in Magpie

1, 3: Musculus levator coccygeus, 2, 4: Musculus coccygeus lateralis, 5: Glandula uropygialis, 6: Papilla uropygialis, 7: Rectrix (Tail feather)

Morfometrik ölçümlerde, glandula uropygialis'in, sağ ve sol lobları arasındaki karşılaştırmada en, boy, yükseklik ve ağırlık değerleri, istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermemiştir ($P>0.05$). Ancak bu değerlendirmelerde, bezin sağ lobunun dorsoventral yüksekliğinin sol lobdan fazla olduğu, sol lobunun da transversal uzunluğunun sağ lobdan fazla olduğu belirlenmiştir. Glandula uropygialis'in her iki lobunun ağırlıklarının ise eşit olduğu tespit edilmiştir. Glandula uropygialis'in papilla'sının morfometrik ölçüm değerlerinin, makro-anatomik görünüme uygun olarak, loblardan daha küçük olduğu ölçüm sonuçlarıyla belirlenmiştir. Glandula uropygialis'in morfometrik ölçüm değerleri ve karşılaştırmaları Tablo 1'de sunulmuştur.

Histolojik inceleme

Saksığan'da glandula uropygialis'in histolojik incelemesinde, bezi oluşturan her bir lobun tubullerinin bir araya gelmesiyle oluştuğu tespit edilmiştir. Sekretuar özellikteki tubullerinin trabekül olarak adlandırılan bir bağ doku tabakası ile çevrelendiği ve bu trabeküllerinin de

fibroblast, düz kas hücreleri ve kan damarlarını içerdiği belirlenmiştir. Özellikle merkezi lumen etrafındaki trabeküllerde, düz kas hücrelerinin daha fazla yoğunlaştığı görülmüştür. Yapılan histolojik incelemelerde ayrıca, saksığanda glandula uropygialis'in, ürettiği salgıyı iç

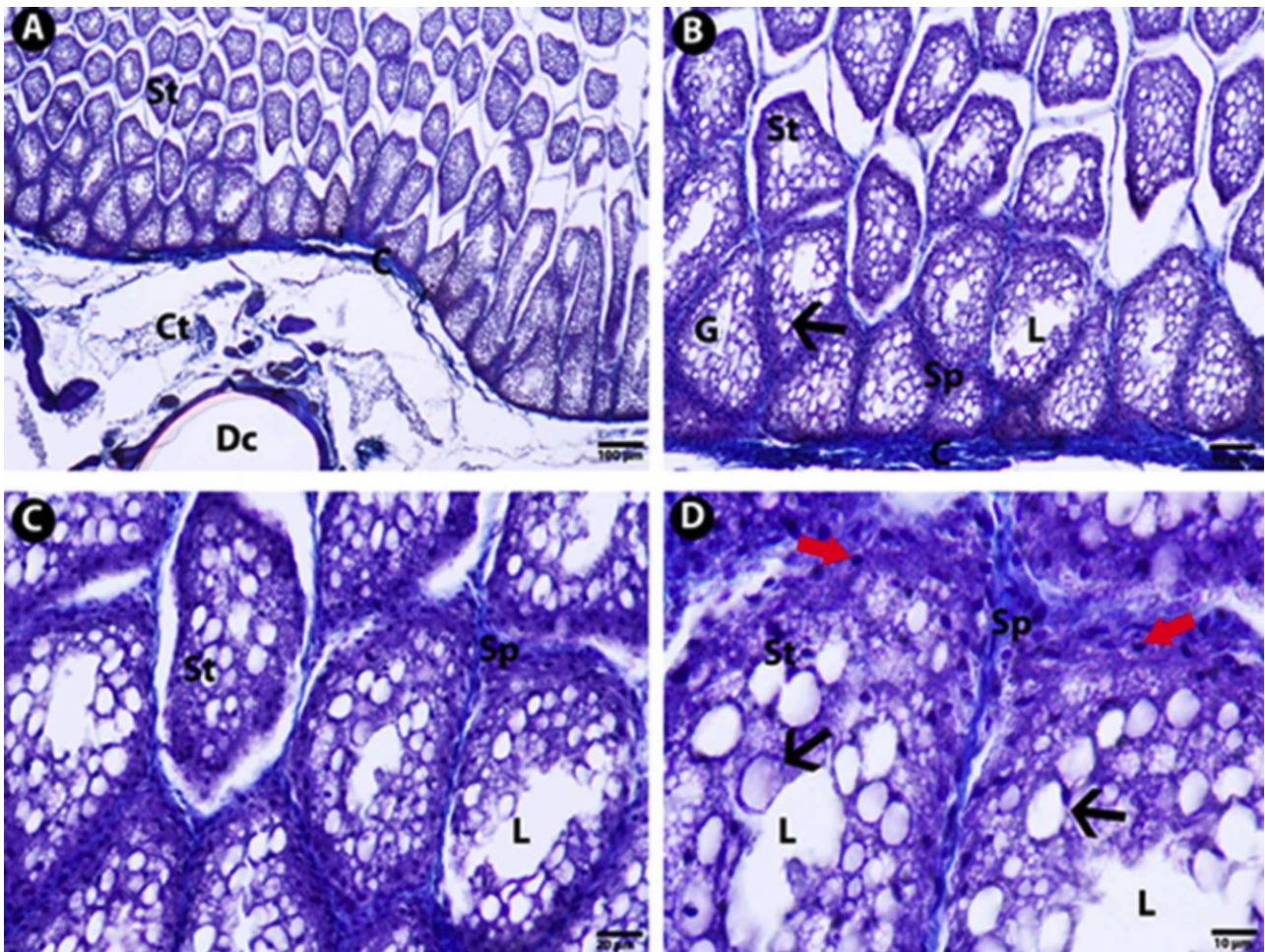
lümene akıtan basit tubuler yapıda holokrin bir bez olduğu belirlendi. Üretilen bu salgının bez içerisinde, küçük ve dar akıtıcı kanallarla papillaya doğru iletilişi tespit edildi. Tubullerin lümenlerinin ise lipitlerle dolu olduğu belirlendi (Şekil 2).

Tablo 1. Saksığanda glandula uropygialis'in morfometrik ölçüm değerleri

Table 1. The morphometric values of glandula uropygialis in Magpie

	Boy (mm)	En (mm)	Yükseklik (mm)	Ağırlık (gr)
Sol Lob	7.01±0.42	5.63±0.13	3.26±0.10	0.06±0.00
Sağ Lob	6.73±0.43	5.81±0.10	3.26±0.14	0.06±0.00
Papilla Uropygialis	2.97±0.14	2.75±0.11	1.95±0.09	0.02±0.01

Veriler ortalama ± standart hata olarak ifade edilmiştir.



Şekil 2. Saksığanda glandula uropygialis'e ait histolojik görüntüler (G; Bez, St; Sekretuar tubul, Dc; Ana akıtıcı kanal, C; Kapsül, Ct; Bağ doku, Sp; Septa, L; Lumen, Siyah oklar; Yağ hücreleri, Kırmızı ok; Tubul trabekülleri fibroblast hücreleri. Crosmen Modifiye Mallory'nin Üçlü Boyaması)

Figure 2. Histological views of glandula uropygialis in Magpie (G; Corpus glandulae, St; Secretory tubule, Dc; Main duct, C; Capsule, Ct; connective tissue, Sp; Septa, L; Lumen, Black arrows; Fat cells, Red arrow; Fibroblast cells of the trabecular tubules Crosmen Modified Mallory's Triple Staining)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Kuşlarda kuyruk bölgesindeki iskelet kaslarının direkt ya da indirekt etkileriyle, glandula uropygialis'teki salgının bezden ayrıldığı bildirilmiştir. Hatta bazı türlerde musculus levator coccygeus'un bezin kapsülüne yapıştığı

da rapor edilmiştir (Jacob ve Ziswiler 1982). Sunulan çalışmada, saksığanda böyle bir bulguya rastlanmamış olup, kuyruk bölgesindeki kasların glandula uropygialis'le bağlantılarının olmadığı ve kuyruk omurlarına yapıştığı tespit edilmiştir. Bu bulgulara paralel olarak, tui kuşu ve çan kuşunda da, kuyruk kaslarının glandula uropygialis'e

yapışmadıkları bildirilmiştir (Kelek ve Çınar 2013). Yapılan bazı çalışmalarda glandula uropygialis'in iki ayrı lobun birleşmesinden meydana geldiği ve türler arasında şekil ve büyüklük bakımından değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Tasbas 1966; Gezici 2002; Salibian ve Montalti 2009). Glandula uropygialis'in güvercin, kaz ve ördekte küçük fındık şeklinde olduğu (Nickel ve ark. 1977; Gezici 2002), bezin son sacral ve ya ilk coccygeal omurun dorsal'inde yerleştiği belirtilmiştir (Nickel ve ark. 1977; Tasbas 1996; Gezici 2002). Yapılan çalışmada, bezin lokalizasyonun ve loblanma şeklinin literatür verileriyle (Nickel ve ark. 1977; Tasbas 1996; Gezici 2002; Salibian ve Montalti 2009) benzer olduğu, ancak görünüm olarak, dorsal'den oval fasulye, caudoventral'den "V" harfi şeklinde görüldüğü tespit edilmiştir. Fakat bazı türlerde bezin hemen kuyruk tüylerinin üzerine yerleştiği (Kelek ve Çınar 2013) veya cloaca üzerinde bulunduğu (Sian 2013) bildirimleri, saksağandaki lokalizasyon bulgularıyla uyusmamaktadır. Çan kuşunda, bezin üzerinin tüylerden yoksun olduğu ve kuyruk bölgesinde açıkta bulunduğu belirtilmiştir (Kelek ve Çınar 2013). Ancak saksağanda bez, tüylerle kaplı derinin altında yerleşmiş olup, ancak deri diseke edildiğinde açığa çıkmaktadır.

Farklı kuş türlerinde yapılan bazı çalışmalarda, glandula uropygialis'e ait her iki lobun da ortak bir kanala açılan ve çevreden merkeze doğru radial tarzda sıralanan tubullerden meydana geldiği ortaya konmuştur (Hodges 1974; Dellmann ve Brown 1987). Yine bildircinde benzer olarak, bezin, tubulo alveolar ve holokrin özellikli, epitel doku ile örtülü çok sayıda tubullerden oluştuğu belirtilmiştir (Kelek ve Çınar 2010). Sunulan çalışmada da, glandula uropygialis'in yapısının literatürle benzer olarak tubulo alveolar yapıda ve holokrin özellikli bir bez olduğu belirlenmiştir. Lucas ve Stettenheim (1972) ile Jacob ve Ziswiler (1982) yaptıkları çalışmalarda çoğu kuş türünde, glandula uropygialis'in histolojik incelemesinde, bezin yapısında, özellikle septum interlobare ve interfolicular septum'larda düz kas hücrelerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde saksağanda da, özellikle trabeküllerde, düz kas hücrelerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak bu tespitlerin aksine, bazı kaynaklarda, kaz (Hou 1928), orman tavuğu (Sawad 2006) ve sığırcık kuşu (Sadoon 2011) gibi kanatlı türlerinin glandula uropygialis'lerinin düz kas hücrelerinden tamamen yoksun olduğu rapor edilmiştir.

Glandula uropygialis'i oluşturan her iki loba ait tubullerin hayvan türlerine göre farklı boyut ve şekilde olan papilla içerisine açıldığı belirtilmiştir (Johnston 1988). Bu papilla'nın bazen makroskobik olarak belirlenemeyecek kadar küçük olduğu, bazen de fırtına kuşu, flamingo, turna ve su kuşlarında olduğu gibi mevcut olmadığı belirtilmiştir (Johnston 1988). Saksağanda ise fırtına kuşu, flamingo, turna ve su kuşlarının aksine papilla'nın varlığı makroskobik olarak belirgin bir şekilde tespit edilmiştir.

Sunulan çalışma ile saksağanda glandula uropygialis'in morfolojik yapısı ortaya konmaya çalışılmıştır. Elde edilen makro- anatomik ve histolojik bulguların, çoğu kanatlı

türleriyle büyük oranda benzerlikler gösterdiği, bazı endemik kanatlı türleri ile farklılıkların bulunduğu belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçların, bu alanda yapılacak araştırmalar için kaynak niteliği taşıyacağı ve literatür bilgisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Baumel JJ, King SA, Breazile JE, Evans HE, Vanden Berge JC (1993).** Handbook of Avian Anatomy. Nomina Anatomica Avium, Cambridge, Massachusetts. 2. Ed. Published By the Club, 22-44.
- Dellmann HD, Brown EM (1987).** Textbook of Veterinary Histology, 3th Ed. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Gezici M (2002).** Evcil Kuşların Anatomisi, Dursun N (Ed), Medisan Yayınevi, Ankara.
- Harem IS, Kocak HM, Turan KT, Akaydin BY, Karadag SE, Altunay H (2010).** Histological structure of the uropygial gland of the osprey (*Pandion haliaetus*). *J Zoo Wildlife Med*, 41 (1): 148-51.
- Hodges R (1974).** The Histology of the Fowl. Academic Press, London.
- Hou HC (1928).** Studies on the glandula uropygialis of birds. *Chinese J Physiol*, 2, 345-380.
- Jacob J, Ziswiler V (1982).** The uropygial gland. in Farner DS and Parkes KC Avian biology: Volume VI, 199-314, New York, America: Academic Press.
- Johnston DWA(1988).** Morphological atlas of the avian uropygial gland. *Bull Br Mus Nat Hist*, 54 (5): 199-259.
- Kelek S, Çınar K (2010).** İnkübasyon ve İnkübasyondan Sonraki Bazı Dönemlerde Bildircin (*Coturnix coturnix japonica*) Üropigi Bezinin Histokimyasal Yapısı. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 24 (1): 29-33.
- Kelek S, Çınar K (2013).** Dişi Ve Erkek Bildircin (*Coturnix Coturnix Japonica*) Üropigial Bez'in Histolojik Ve Histokimyasal Yapısı. *Erzincan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 2 (2): 229-238.
- King AS, McLelland J (1985).** Form and function in birds. Academic Press, London, Great Britain.
- Lucas AM, Stettenheim PR (1972).** Avian Anatomy: Integument. Agriculture Handbook 362, U. S. Department of Agriculture., Washington, D. C.
- Martin VM, Ruiz RM, Jose SJ, Peralta JM, Mendez M, Valdivia E, Martin PAM, Martinez BM (2009).** Seasonal, sexual and developmental differences in hoopoe *Upupa epops* preen gland morphology and secretions: evidence for a role of bacteria. *J Avian Biol*, 40, 191- 205.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (1977).** Anatomy of the domestic birds. Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg.
- Önal Ö, Türk S, Çınar K (2013).** Dişi ve erkek keklik (*Alectoris chukar*) üropigial bezinin histolojik ve histokimyasal özellikleri. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 27 (1): 7 - 12.
- Sadoon AH (2011).** Histological study of European starling uropygial gland (*Sturnus vulgaris*). *Int J Poult Sci*, 10, 662-664
- Salibian A, Montalti D (2009).** Physiological and biochemical aspects of the avian uropygial gland. *Braz J Med Biol Res*, 69 (2): 437-46.
- Sawad AA (2006).** Morphological and histological study of uropygial gland in moorhen (*Gallinula choropus*). *Int J Poult Sci*, 938-941.
- Sian R (2013).** The Anatomy and Histomorphology of the Uropygial Gland in New Zealand Endemic Species. Massey University, Palmerston North, New Zealand.
- Stettenheim PR (2000).** The integumentary morphology of modern birds – an overview. *Am Zool*, 40, 461- 477.
- Taşbaş M (1996).** Veteriner Aesthesiologia. Tamer Yayınları, Ankara.
- Vincze O, Vágási CI, Kovács I, Galván I, Pap PL (2013).** Sources of variation in uropygial gland size in European birds. *Biol J Linn Soc*, 110, 543-563.



Determination of *L. monocytogenes*, and its Antibiotic Resistance of Local Produced Cheese Consuming in Hatay

Sevda PEHLIVANLAR ONEN Mehmet ELMALI

Mustafa Kemal University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Hatay, Turkey

Received: 16.01.2016

Accepted: 25.02.2016

SUMMARY

In this study, it was evaluated of the risk in terms of public health because of the occurrence of *L. monocytogenes* in local produced cheese in Hatay, and its resistance against some antibiotics. 116 local produced cheese obtained from village and district markets were used as material. Classical culture methods and PCR techniques were used in microbiological analysis. The susceptibility tests of the antibiotics, ampicillin (10 µg), gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), tetracycline (30 µg), chloramphenicol (30 µg), erythromycin (15 µg) and vancomycin (30 µg) applied to the obtained isolates via disk diffusion method, and data was evaluated according to CLSI 2012 and EUCAST 2014. *L. monocytogenes* was detected in 20 of 116 (17.24%) samples. It was observed that among the obtained isolates, 1 isolate (5%) vancomycin, 2 isolates (10%) chloramphenicol, 6 isolates (30%) tetracycline, 1 isolate (5%) ampicillin, 4 isolates (20%) erythromycin, 5 isolates (25%) against gentamicin is resistant and all of the isolates is sensitive against streptomycin. Determination of *L. monocytogenes* as ratio of 17.24% in the local produced cheese samples that collected from different districts of Hatay province, and detection of resistance of these isolates against to the different antibiotics was evaluated as a risk factor in terms of public health. It was suggested that advanced research should be focused on development of standard production technique in local products, control of production and sales point, and conscious antibiotics usage.

Key Words: Cheese, *L. monocytogenes*, Antibiotic resistance

ÖZET

Hatay'da Tüketime Sunulan Yöresel Peynirlerde *Listeria monocytogenes* Varlığı ve Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Bu çalışma ile Hatay'da üretilen yöresel peynir örneklerinde *Listeria monocytogenes* varlığı ve elde edilen izolatların bazı antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi ile halk sağlığı açısından oluşturabileceği riskin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada; Hatay ilinde bulunan köy ve semt pazarlarından temin edilen 116 adet yöresel peynir örneği materyal olarak kullanılmıştır. Örneklerden klasik kültür metodu ile *L. monocytogenes* izolasyonu yapılarak, izolatlar PCR tekniği ile doğrulanmıştır. Elde edilen izolatlara disk difüzyon metodu ile ampisilin (10 µg), gentamisin (10 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg) ve vankomisin (30 µg) yönünden antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak elde edilen sonuçlar CLSI 2012 ve EUCAST 2014'e göre değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda 116 örneğin 20'sinden (%17.24) *L. monocytogenes* identifiye edilmiş, elde edilen izolatların 1'inin (%5) vankomisin, 2'sinin (%10) kloramfenikol, 6'sının (%30) tetrasiklin, 1'inin (%5) ampisilin, 4'ünün (%20) eritromisin ve 5'inin de (%25) gentamisin'e karşı dirençli, tamamının ise streptomisine duyarlı olduğu saptanmıştır. Hatay'da farklı noktalardan toplanan yöresel peynir örneklerinden *L. monocytogenes*'in %17.24 oranında izole edilmesi ve bu izolatların farklı antibiyotiklere direnç göstermesi halk sağlığı açısından risk faktörü olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle bu tip yöresel ürünlerde standart üretim tekniklerinin belirlenmesi, üretim ve satış noktalarında denetimlerin ve bilinçli antibiyotik kullanımının sağlanması yönünde çalışmaların yapılması önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Peynir, *L. monocytogenes*, Antibiyotik direnci

GİRİŞ

Listeria monocytogenes, *Listeriaceae* familyasında, psikrotrof özellikte, geniş pH aralıklarında üreyebilen ve ubiquiter karakter gösterebilen patojen bakterilerdir (Harrigan 1998; Erol 2007). *L. monocytogenes*, koyun, keçi ve sığırlarda ensefalit, abort ve septicemiye, domuz ve kanatlılarda ise septicemiye neden olmaktadır. İnsanlarda meningoensefalit ve septicemiye neden olmakta ve immunsupresif gruplarda ise yüksek oranlarda ölüme yol açabilmektedir (Schlech 2000). *L. monocytogenes* intraselüler bir patojendir ve önemli virulens faktörlerinden biri spesifik bir hemolizin olan Listeriolizin-O (LLO)'dur. Bu nedenle *hlyA* gen analizi *L. monocytogenes* saptanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Low ve ark. 1992; Ormancı ve ark. 2008; Elmalı ve ark. 2015). Çeşitli gıdalardan izole edilen *L. monocytogenes* önemli bir gıda patojeni olup, ilk gıda kaynaklı listerioz 1981'de (Schlech ve ark. 1983) bildirilmiştir. Gıda kaynaklı *Listeria* enfeksiyonları çoğu yumuşak peynirler olmak üzere süt ürünleri, kırmızı et, kanatlı eti, su ürünleri, salatalar ve hazır gıdalardan kaynaklanmaktadır (Ekici ve ark. 2004; Swaminathan ve Gerner-Smidt 2007; Elmalı ve ark. 2013). Ülkemizde ve Dünya'da yasal mevzuata göre analiz edilen gıda örneklerinin 25 gramında *L. monocytogenes*'in bulunmaması gerektiği bildirilmektedir (Anon 1995; Anon 2011)

Gram (+) bakterilere karşı etkin olan antibiyotiklerin aynı zamanda *L. monocytogenes*'e duyarlı olduğu kabul edilmiştir. Listeriozise karşı, immunsupresif hastalarda etkin tedavi seçeneği, penisilin, ampicilin gibi beta-laktam antibiyotiklerin tek başına veya gentamisin gibi aminoglikozidler ile kombine olarak kullanımudur. İkinci tedavi seçeneği, beta-laktamlara allerjisi olan hastalarda, trimetoprim ve sülfamid kombinasyonudur. Listerioz teşhisi konan hamile hastalarda sıklıkla vankomisin ve eritromisin kullanılır. Bunlar dışında rifampicin, tetrasiklin, kloramfenikol ve fluoroglunose da tedavide kullanılan diğer antibiyotik seçenekleridir (Conter ve ark. 2009; Mackiw ve ark. 2016).

Gıdalarda antibiyotik dirençli bakterilerin çoğu, doğal mikrofloradaki saprofit bakterilerdir. Bu direnç genleri, transpozon ve plazmidler gibi hareketli genetik yapılar ile gastrointestinal sistemdeki *L. monocytogenes* gibi gıda patojenlerine aktarılır. Direnç genleri diğer Gram (+) ve Gram (-) bakterilerden de aktarılabilir. Bu klinik olgularda tedaviyi zorlaştıran veya engelleyen bir durum olduğu için önemlidir (Öztürk 2002; Conter ve ark. 2009). Son yıllarda bakterilerde antimikrobiyel direnç gelişmesinin dünya genelinde ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğu tüm otoritelerce kabul edilmektedir (İstanbulluoğlu 2012).

Sunulan çalışmada Hatay yöresel peynirlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı ve elde edilen izolatların bazı antibiyotiklere karşı dirençliliklerinin belirlenmesi ile halk sağlığı açısından oluşturabileceği riskin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada, Mart-Ağustos (2014) ayları arasında, Hatay ilinde farklı köy ve semt pazarlarından temin edilen 116 adet yöresel peynir örneği (beyaz peynir, dil peyniri, örgü peyniri, sıkma peynir vb.) materyal olarak kullanıldı.

Aseptik koşullarda alınarak, soğuk zincir altında laboratuvara getirilen peynir örneklerinin her biri steril polietilen poşetlere 25 g tartılıp, üzerine 225 ml ONE Broth-*Listeria* (Oxoid) katılarak, stomacherde homojenize edildi ve zenginleştirme amacıyla aerob koşullarda 30 °C'de 24

saat inkübasyona bırakıldı. Zenginleştirme işleminden sonra, homojenizattan 0.1 ml alınarak Brilliance *Listeria* (Oxoid) Agar'a çizme plak yöntemiyle ekildi ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Yeşil-mavi koloniler (zon oluşturan veya oluşturmayan) *Listeria* spp. şüpheli koloniler olarak kabul edildi (Oxoid 2012). Şüpheli koloniler Trypticase Soy Yeast Extract Agar'a geçildi ve 30 °C'de 24-48 saat sonra üreyen kolonilerden Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif, hareketli koloniler *Listeria* spp. olarak tanımlandı (Harrigan 1998). İzolatlar hemoliz, CAMP test, karbonhidrat redüksiyon testleri (L-rhamnoz, D-ksiloz, D-mannitol) uygulandı. Elde edilen izolatlar DNA ekstraksiyonunda kullanıldı. Takiben, PCR tekniği ile *hlyA* geni yönünden incelenerek *L. monocytogenes* olarak belirlendi.

Araştırmada DNA ekstraksiyonu amacıyla ticari kit (Nucleic Acid Extraction Kit, GF-1, Vivantis, Malaysia) kullanıldı. Ekstraksiyon kitte belirtilen protokole göre yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri analiz edileceği süreye dek -20 °C'de depolandı.

PCR Analizi: Bu çalışmada *Listeria monocytogenes* için tür spesifik olan *hlyA* geninin saptanması amaçlandı. Aşağıda dizilimi verilen primer ve reaksiyon bileşeni kullanıldı (Bohnert ve ark. 1992).

PCRG0:5'-GAA TGT AAA CTT CGG CGC AAT CAG-3';

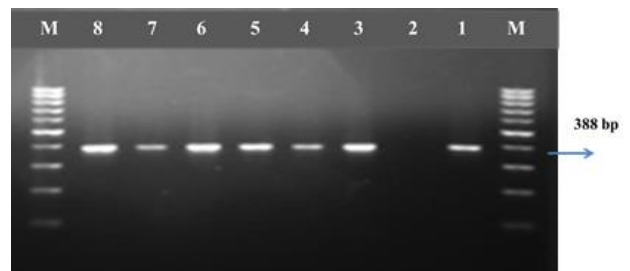
PCRDO:5'-GCC GTC GAT GAT TTG AAC TTC ATC-3'.

Reaksiyon bileşenleri; 1xPCR buffer (Sigma-Aldrich), 0.2 mM dNTP mix (Sigma-Aldrich), 1.5 mM MgCl₂ (Sigma-Aldrich), 0.50 pmol primer (biotech, GmbH), 1 U *Taq* DNA polimerase enzimi (Sigma-Aldrich) ve 10 µl template DNA olarak hazırlandı (Bohnert ve ark. 1992). Başlangıç denaturasyon 98 °C'de 30 saniye, 30 siklus denaturasyon 98 °C'de 7 saniye, annealing 60 °C'de 20 saniye, extension 72 °C'de 20 saniye ve final extension 72 °C'de 7 dakika olarak uygulandı (Boeco, Hamburg, Germany). Takiben, amplifikasyon ürünleri agaroz jelde (% 1.5) elektroforezde 120 V'da 40 dakika (Cleaver, CS-300V, England) sonunda UV transilluminasyon'de (UVP, Upland, USA) değerlendirildi (Elmalı ve ark. 2015).

Elde edilen *L. monocytogenes* izolatlarına, ampicilin (10 µg), gentamisin (10 µg), streptomisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), kloramfenikol (30 µg), eritromisin (15 µg) ve vankomisin (30 µg) yönünden antibiyotik duyarlılık testleri, disk difüzyon metodu ile yapılarak, EUCAST 2014'e ve CLSI 2012'ye göre değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışma sonucunda analize alınan 116 peynir örneğinin 20'sinden (%17.24 oranında) *L. monocytogenes* izole ve identifiye edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *hlyA* pozitif *L. monocytogenes* izolatlarının elektroforezdeki görüntüsü. (1; Pozitif kontrol, 2; Negatif kontrol, 3-8; *Listeria monocytogenes*)

Figure 1. Electrophoresis image of *hlyA* positive *L. monocytogenes* isolates. (1; Positive control, 2; Negative control, 3-8; *Listeria monocytogenes*)

İzolaların 1'inin (%5) vankomisin, 2'sinin (%10) kloramfenikol, 6'sının (%30) tetrasiklin, 1'inin (%5) ampisilin, 4'ünün (%20) eritromisin ve 5'inin de (%25) gentamisine karşı dirençli, tamamının ise streptomisine duyarlı olduğu saptanmıştır.

Çalışmada saptanan 20 *L. monocytogenes* izolatının, 10'u (%50) tüm antibiyotiklere karşı kısmi veya tam duyarlı olarak belirlenmiştir. Antibiyotik direnç saptanan 10 izolatın; 6'sının (%30) bir, 1'inin (%5) iki, 2'sinin (%10) üç ve 1'inin (%5) ise beş antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdiği saptanmıştır.

Tablo 1. Antibiyotik dirençlilik-duyarlılık testi sonuçları

Table 1. Antibiotic resistance-susceptibility test results

Örnek	VA*	C*	TE*	AM**	E**	GM*	HLS*
	12 S	15 S	8 S	19 S	8 S	13 S	20 S
20	7 I	3 I	6 I	---	8 I	2 I	---
	1 R	2 R	6 R	1 R	4 R	5 R	---
S (%)	60	75	40	95	40	65	100
R (%)	5	10	30	5	20	25	0

VA: vankomisin, C: kloramfenikol, TE: tetrasiklin, AM: ampisilin, E: eritromisin, GM: gentamisin, HLS: streptomisin; S:Duyarlı R: Dirençli
*. CLSI 2012 *Staphylococcus* spp.'ye göre değerlendirilmiştir** EUCAST 2014 *L. monocytogenes*'e göre değerlendirilmiştir

TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışma sonucunda ısı işlem görmemiş sütlerden yapılan yöresel peynirlerde %17.24 oranında *L. monocytogenes* saptanmıştır. Bu sonuç; Lovett ve ark. (1987) tarafından sütlerde (%20), Özkaya ve Yıldırım (2010) tarafından Kayseri'de çiğ sütlerde (%14), Gülmez ve Güven (2001) tarafından beyaz peynirlerde (%15) ve Mena ve ark. (2004) tarafından çiğ sütte (%16.7) saptanan *L. monocytogenes* izolasyon oranları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada yukarıdaki çalışmalarla benzer şekilde yüksek izolasyon oranlarının elde edilmesi, incelenen süt örneklerinin çiğ veya yetersiz ısı işlem görmüş olmasına, uygun hijyenik şartlarda üretim ve satışı yapılmamasına bağlanabilir.

Ülkemizde konu ile ilgili yapılan bazı çalışmalarda; Büyükyörük ve Göksoy (2011) Aydın ili köy peynirinde *L. monocytogenes* saptamadıklarını, Karada ve Yıldırım (2014) Niğde'de çiğ süttten yapılan peynirlerde %1, Çetinkaya ve ark. (1999) taze peynirlerden yaklaşık %2, Sağun ve ark. (2001) çiğ süt örneklerinde %1.20, Aygün ve Pehlivanlar (2006) beyaz peynir örneklerinde %2.35, Dümen ve ark. (2011) peynir örneklerinde %2, Soyutemiz ve ark. (2001) çiğ süt örneklerinde %3, Erol ve Şireli (2002) çiğ ve pastörize sütte sırası ile %1 ve %5, Çolak ve ark. (2007) tulum peynirlerinde %4.8, Akkaya ve Alisharlı (2006) beyaz peynirlerde %6, Arslan ve Özdemir (2008) ev yapımı beyaz peynirlerde %9.2 ve Ceylan ve Demirkaya (2007) beyaz peynir örneklerinde %3.45 oranında *L. monocytogenes* saptadıklarını bildirmişlerdir. Diğer araştırmacıların tespit ettiği yukarıdaki sonuçların, bu çalışmada elde edilen oranlara göre oldukça düşük olması, izolasyon metotlarına, peynir üretim tekniklerine, hayvanların bakım ve besleme şartlarına ve bölgesel-mevsimsel farklılıklara bağlanabilir.

L. monocytogenes'in diğer *Listeria* türleri gibi genellikle geniş bir antibiyotik grubuna karşı duyarlı olduğu (Hof ve ark. 1997), 1988'de Fransa'da ilk çoklu direnç gösteren tür izole edildiğinden beri (Poyard-Salmeron ve ark. 1990) pek

çok araştırmacı bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren, gıda kaynaklı listerioza neden olan türleri saptadıklarını bildirmişlerdir (Zhang ve ark. 2007; Ormanlı ve ark. 2008; Granier ve ark. 2011).

Bu çalışmada izole edilen 20 *L. monocytogenes* izolatının 10'unun (%50) vankomisin, kloramfenikol, tetrasiklin, ampisilin, eritromisin, gentamisine karşı kısmi veya tam duyarlı, tümünün (%100) ise streptomisine duyarlı olduğu saptandı. Şireli ve Gücükoğlu (2008), Conter ve ark. (2009), Karada ve Yıldırım (2014), benzer şekilde antibiyotiklere duyarlılık saptadıklarını bildirmişlerdir.

Antibiyotik direnç saptanan 10 izolatın, %30'unun bir, %5'inin iki, %10'unun üç ve %5'inin de beş antibiyotiğe karşı çoklu direnç gösterdikleri saptanmıştır. Yan ve ark. (2010), Granier ve ark. (2011) ve Rahimi ve ark.'da (2012) benzer şekilde antibiyotiklere çoklu direnç saptadıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda saptadığımız *L. monocytogenes* ampisilin direnç oranı %5, Mackiw ve ark.'nın (2016) araştırma bulguları (%9.5) ile benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda *L. monocytogenes*'in tetrasikline dirençliliği %30 olarak saptanırken, Filiouis ve ark. (2009) Yunanistan'da peynir örneklerinde %8 oranında *L. monocytogenes* saptadıklarını ve bu suşların tetrasikline karşı dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Farklı araştırmacıların gıda kaynaklı *L. monocytogenes* izolatlarının antibiyotik dirençliliği hakkında yaptıkları değişik çalışmalarda; Conter ve ark. (2009) tüm izolatların benzilpenisilin, ampisilin/sulfaktam, imipenem, gentamisin ve teicoplanin'e duyarlı, diğer antibiyotiklere değişen oranlarda dirençli olduklarını, Granier ve ark. (2011) tüm izolatların penisilin, gentamisin, linezolid, rifampin ve vankomisin'e duyarlı, sefalosporine ise dirençli olduğunu, sadece 4 suşta kazanılmış direnç saptadıklarını ve bunlardan 2'sinin eritromisin, 1'inin tetrasiklin, 1'inin de trimetoprim-tetrasikline dirençli olduğunu bulduklarını, Rahimi ve ark. (2012) elde ettikleri izolatların tümünün vankomisin ve gentamisin'e duyarlı, 2'sinin ampisilin, 1'inin kloramfenikol, 1'inin siproflaksosin, 3'ünün eritromisin,

3'ünün nalidiksik asit, 3'ünün penisilin ve 3'ünün de tetrasikline dirençli olduğunu, Şireli ve Gücükoğlu (2008) inceledikleri izolatların tümünün rifampine dirençli, kloramfenikol, trimetoprim, tetrasiklin ve tobramisine duyarlı olduklarını, Karada ve Yıldırım (2014) araştırdıkları suşların nalidiksik asite dirençli, tetrasiklin, siprofloksasin, gentamisin, ampisilin, eritromisin, trimetoprim, vankomisin, kloramfenikol, nalidiksik asit, penisilin G ve sülfonilamide duyarlı olduğunu, Yan ve ark. (2010) izolatların siprofloksasine (%17.8), tetrasikline (%15.6) ve streptomisine (%12.2) oranlarında dirençli olduğunu, Zhang ve ark. (2007) izolatların sülfonamide %73, tetrasikline %8.4 ve siprofloksasine %1.8 oranında dirençli olduğunu ve Ormancı ve ark. (2008), inceledikleri izolatların %82.6 oranında penisilin G ve %73.9 oranında ampisiline dirençli olduğunu, eritromisin ve streptomisine kısmi dirençli olduklarını bildirmişlerdir.

Antibiyotik duyarlılığı konusunda farklı bilim adamlarının farklı sonuçlar elde etmesinde çevre, coğrafi bölgeler, hatta enfekte gıdaların içerdikleri saprofit mikroorganizmaların sayısı ve oranı ile *L. monocytogenes* serotiplerinin farklılığının, genetik çeşitliliğine bağlı olarak antibiyotik dirençliliği üzerine etkisinin olduğu (Yan ve ark. 2010; Dümen ve ark. 2011; Mackiw ve ark. 2016) ve bundan dolayı gelecekte *L. monocytogenes* varlığı ve antibiyotik dirençliliğinin sürekli olarak izlenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır.

Araştırmada incelenen örneklerde *L. monocytogenes* (%17.24) yüksek oranda saptanması, süte yeterli ısı işlem uygulanmaması, üretim ve satış yerlerinde hijyen eksikliği, örneklerin ilkbahar-yaz döneminde toplanmış olması, sağlıklı hayvan-sağlıklı hammadde temelinde problemler olması ile açıklanabilir. Bulgularımıza benzer şekilde, dünyada ve ülkemizde *L. monocytogenes*'in antibiyotik dirençliliği üzerine yapılan pek çok çalışmada düşük seviyelerde de olsa çoklu antibiyotik direnç tespit edildiği bildirilmiştir. Bütün bu nedenlerden dolayı bu tür ürünlerde *L. monocytogenes* kontaminasyonunun izlenmesi ve bu ürünlerin üretiminden tüketimine kadar geçen tüm aşamalarda hijyen ve kontrol uygulamalarına azami derecede dikkat edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Akkaya L, Alişarlı M (2006).** Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığının belirlenmesi. *YYU Vet Fak Derg*, 17(1-2):87-91.
- Anon (1995).** Microbiological Reference criteria for food. Food Administration Manuel. Version 2.0, October, p. 12-22.
- Anon (2011).** Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği. Aralık, Sayı: 28157.
- Arslan S, Özdemir F (2008).** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* spp. in homemade white cheese. *Food Control*, 19, 360-363.
- Aygün O, Pehlivanlar S (2006).** *Listeria* spp. in the raw milk and dairy products in Antakya, Turkey. *Food Control*, 17, 676-679.
- Büyükyörük S, Göksoy EÖ (2011).** Aydın ilinde satışa sunulan köy peynirlerinde *Listeria* varlığının araştırılması. *Uludağ Univ J Fac Vet Med*, 30(1):9-12.
- Bohnert M, Dilasser F, Dalet C, Mengaut J, Cossart P (1992).** Use of specific oligonucleotide for direct enumeration of *Listeria monocytogenes* in food samples by colony hybridization and rapid detection by PCR. *Res Microbiol*, 143, 271-280.
- Ceylan ZG, Demirkaya AK (2007).** Erzurum piyasasından temin edilen salamura beyaz peynirlerde *Listeria monocytogenes* varlığı ve bazı mikrobiyolojik özelliklerinin belirlenmesi. *Atatürk Üniv Ziraat Fak Derg*, 3(2):137-141.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2012).** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty second informational supplement (vol.33.3). Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Document M100-S22-2.

- Conter M, Paludi D, Zanardi E, Ghidini S, Vergara A, Ianier A (2009).** Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*, 128, 497-500.
- Çetinkaya B, Ertaş HB, Muz A (1999).** Süt ürünlerinde *Listeria* türlerinin izolasyonu. *Fırat Üniv Sağlık Bil Derg*, 13, 21-25.
- Çolak H, Hampikyan H, Bingöl EB, Ulusoy B (2007).** Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in tulum cheese. *Food Control*, 18, 576-579.
- Dümen E, Issa G, İkiz S, Bağcıgil F, Özgür Y, Kahraman T, Ergin S, Yeşil O (2011).** Determining existence and antibiotic susceptibility status of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy products, serological and molecular typing of the isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 111-119.
- Ekici K, İşleyici Ö, Sağun E (2004).** Süt ve süt ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. *YYU Vet Fak Derg*, 15(1-2): 97-101.
- Elmalı M, Can HY, Yaman H (2015).** Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat. *Food Science and Technology*, DOI:http://dx.doi.org/10-1590/1678-457x6808.
- Elmalı M, Öner S, Yaman H (2013).** Detection of *Listeria monocytogenes* by using PCR method in refrigerated ready-to-eat food consumed in Turkey. *Med Weter*, 69(1): 36-39.
- Erol İ, Şireli, UT (2002).** Occurrence and contamination levels of *Listeria* spp. in milk and dairy products in Ankara. FEMS Symposium on the Versatility of *Listeria* Species, 10-11 October, Izmir, Turkey.
- Erol İ (2007).** Gıda Hijyeni ve Mikrobiyolojisi. Pozitif Matbaacılık, Ankara, s.126-134.
- EUCAST (2014).** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. <http://www.eucast.org>. Erişim Tarihi: 09.11.2015.
- Filiouis G, Johansson A, Frey J, Perreten V (2009).** Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control*, 20, 314-317.
- Granier SA, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao T, Courvalin P, Brisabois A (2011).** Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolates from food and the environment in France over a 10-year period. *Appl and Env Microbiol*, 77(8): 2788-2790.
- Gülmez M, Güven A (2001).** Kars ilinde satışa sunulan çeşil (civil) peynirlerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 7, 63-70.
- Harrigan FW (1998).** Laboratory Methods in Food Microbiology. Academic Press. San Diego, USA. p:198-200.
- Hof H, Nichterlein T, Kretschmar M (1997).** Management of listeriosis. *Clin Microbiol Rev*, 10, 345-357.
- İstanbuluoğlu E (2012).** Antimikrobiyal direnç: küresel gizli bir salgın. Bilinçli Antibiyotik Kullanımı ve Antimikrobiyel Direnç Sempozyumu (Uluslararası Katılımlı). 18 Ekim, Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı - Ankara, s.7-20.
- Karada F, Yıldırım Y (2014).** Antimicrobial susceptibility and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from raw milk cheese samples sold in Nigde. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 61, 255-260.
- Lovett J, Francis DW (1987).** *L. monocytogenes* in raw milk, detection, incidence and pathogenity. *J Food Protect*, 50(3): 188-192.
- Low JC, Davies RC, Donachie W (1992).** Purification of listeriolysin-O and development of an immunoassay for diagnosis of listeric infections in sheep. *J Clin Microbiol*, 30, 2705-2708.
- Mackiw E, Modzelewska M, Maka M, Scienzynska H, Powlowska K, Postupolski J, Korsak D (2016).** Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from ready-to-eat products in Poland in 2007-2011. *Food Control*, 59, 7-11.
- Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs P (2004).** Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol*, 21, 213-216.
- Ormancı Bilir FS, Ayaz ND, İşeri O, Sarıgüzel D (2008).** Immunomagnetic separation and PCR detection of *Listeria monocytogenes* in turkey meat and antibiotic resistance of the isolates. *British Poultr Sci*, 49(5): 560-565.
- OXOID (2012).** Culture Media. İnternet erişimi; www.oxoid.com/pdf/27361_Brilliance_Listeria.pdf. Erişim Tarihi: 10.04.2014.
- Özkaya K, Yıldırım Y (2010).** Kayseri de satışa sunulan çiğ süt numunelerinde *Listeria monocytogenes* varlığının klasik kültür yöntemi ile belirlenmesi. *Kocatepe Vet J*, 3(2): 25-29.
- Öztürk R (2002).** Antibiyotik kullanımı ve erişkinde toplumda edinilmiş enfeksiyonlar. *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Sempozyum Dizisi*, 31, 83-100.
- Poyart-Salmeron C, Carlier C, Trieu-Cuot P, Courtieu AL, Courvalin P (1990).** Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. *The Lancet*, 335, 1422-1426.
- Rahimi E, Momtaz H, Sharifzadeh A, Behzadnia A, Ashtari MS, Esfahani ZS, Riahi M, Momeni M (2012).** Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria* species isolated from traditional dairy products in Chahar Mahal & Bakhtiari, Iran. *Bulgarian J Vet Med*, 15 (2): 115-122.

- Sağun E, Sancak YC, İşleyici O, Ekici K (2001).** The presence and prevalence of *Listeria* species in milk and herby cheese in and around Van. *Turk J Vet Anim Sci*, 25, 15–19.
- Schlech WF (2000).** Foodborne listeriosis, *Clin Infect Dis*, 31, 770–775.
- Schlech WF, Lavigne PM, Bortolussi, RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV (1983).** Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. *NewEngland J Med*, 308, 203–206.
- Soyutemiz E, Çetinkaya F, Özakin C, Gedikoğlu, S (2001).** Presence of *Listeria monocytogenes* in raw milk samples from West Anatolia. *Turk J Infect*, 15, 5–9.
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P (2007).** The epidemiology of human listeriosis, *Microbes and Infect*, 9, 1236-1243.
- Şireli UT, Gücükoğlu A (2008).** Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* spp. isolated from ready-to-eat foods in Ankara. *Turk J Vet Anim Sci*, 32(2): 131-135.
- Yan H, Neogi SB, Mo Z, Guan W, Shen Z, Zhang S, Li L, Yamasaki S, Shi L, Zhong N,(2010).** Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005–2007. *Int J Food Microbiol*, 144, 310–316.
- Zhang Y, Yeha E, Hallb G, Cripeb J, Bhagwatc AA, Menget J (2007).** Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods. *Int J Food Microbiol*, 113, 47–53.





Prevalence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes* in some ready to eat foods sold retail in Balıkesir

Mukadderat GOKMEN¹ Levent AKKAYA¹ Recep KARA² Adem ONEN¹

¹Balıkesir University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Balıkesir, Turkey

²Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Food Hygiene and Technology, Afyonkarahisar, Türkiye

Received: 10.01.2016

Accepted: 14.03.2016

SUMMARY

In this study, some ready-to-eat foods (meat doner, chicken doner, fermented sausage (sucuk), braised meat, white pickled cheese, hoşmerim, halva, russian salad, vegetable salad) which presented for sale and consumption in the supermarkets and restaurants in Balıkesir, were investigated for *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, and *Salmonella* spp. Microbiological analyses of ready to eat samples were used conventional culture method. A total of 235 ready-to-eat food samples, 22 isolates (9.4%) were identified as *Listeria* spp. and 5 isolates (2.1%) were identified as *L. monocytogenes*, and 3 isolates (1.3%) were identified as *Salmonella* spp. *L. monocytogenes* were detected in white pickled cheese and vegetable salad samples and *Salmonella* spp. were detected in chicken doner, braised meat and halva samples. As a result, the presence of pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in ready-to-eat foods, constitutes a major risk in terms of public health. Especially heat treatment should be adequate in the production step of these types of foods and post-processing contamination should be avoided. On the other hand, GMP, GHP and HACCP regulations should be implemented in production, processing, packaging and storage stage.

Key Words: Ready-to-eat foods, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.

ÖZET

Balıkesir’de satışa sunulan bazı tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes*’in yaygınlığı

Bu çalışmada, Balıkesir’de marketlerde ve restoranlarda satışa ve tüketime sunulan bazı tüketime hazır gıdalar (et döner, tavuk döner, fermente sucuk, kavurma, beyaz peynir, hoşmerim, helva, rus salatası, sebze salatası) *Listeria* spp., *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. yönünden araştırıldı. Tüketime hazır gıda örneklerinin mikrobiyolojik analizlerinde klasik kültür tekniği kullanıldı. Toplam 235 tüketime hazır gıda örneğinin 22’sinde (%9.4) *Listeria* spp. ve 5’inde (%2.1) *L. monocytogenes* ve 3’ünde (%1.3) *Salmonella* spp. saptandı. Beyaz peynir ve sebze salatası örneklerinde *L. monocytogenes* ve tavuk döner, kavurma ve helva örneklerinde *Salmonella* spp. tespit edildi. Sonuç olarak tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. gibi patojen bakterilerin bulunması halk sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Özellikle bu tip gıdaların üretim basamaklarında uygulanan ısıl işlem yeterli olmalı ve proses sonrası kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Diğer yandan üretim, işleme, ambalajlama ve depolama aşamalarında GMP, GHP ve HACCP kurallarına uyulmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Tüketime hazır gıda, *Listeria* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp.

GİRİŞ

Tüketime hazır gıda; gıda işletmecisi tarafından gıdanın mikrobiyel yükünü azaltacak veya kabul edilebilir seviyeye düşürecek pişirme veya herhangi başka bir işleme ihtiyaç olmaksızın, doğrudan insan tüketimine sunulması amaçlanarak üretilen gıdadır (TGK Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği 2011). Modern yaşam içinde tüketiciler

özellikle tüketime hazır gıdaların kullanılabilir, kaliteli ve güvenilir olmasını talep etmektedir (Angelidis ve ark. 2006).

Gıdaların bakteriyel, viral, paraziter ya da kimyasal kirlenme nedeniyle kontaminasyonu sonucu meydana gelen gıda kaynaklı hastalıklar dünyada geniş bir yelpaze içinde yer almaktadır (Teplitski ve ark. 2009). Dünyada

Listeria monocytogenes ve *Salmonella* spp.'den ileri gelen gıda kaynaklı enfeksiyonlar ilk sıralarda yerini korumaktadır. *L. monocytogenes*, doğada yaygın olarak bulunmaktadır (Farber ve Harwig 1996). Gıda işleme ortamlarında olumsuz şartlara rağmen on iki yıldan daha fazla canlılığını sürdürdüğü ve aralıklı olarak gıdalarda kontaminasyona neden olduğu rapor edilmiştir (Holah ve ark. 2004; Lambertz ve ark. 2012). Önceleri yalnızca hayvanlar için patojen olduğu düşünülürken, özellikle son 25 yıldır gıda kaynaklı Listeriozise neden olmasından dolayı zoonoz olarak gıda endüstrisinde kaygı verici bir duruma gelmiştir (Carrasco ve ark. 2007).

Listeriozis, özellikle *L. monocytogenes*'in neden olduğu gıda kaynaklı bir hastalık olup, dünya çapında önemli halk sağlığı sorunu olarak kabul edilmektedir. Gelişmiş ülkelerde Listeriozis vakaları 1.000.000'da 4 ile 8 arasında değişmektedir (Ivanek ve ark. 2005). İnsanlar da görülen çoğu Listeriozis vakalarının, buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilen ve yüksek düzeyde *L. monocytogenes* ile kontamine olmuş hazır gıdaların tüketimi sonucu meydana geldiği ileri sürülmektedir (Chan ve Wiedmann 2008). *L. monocytogenes* çeşitli işlenmiş ve işlenmemiş gıdalarda bulunabilmektedir. Bunlardan süt ve süt ürünleri, çeşitli et ve et ürünleri (sığır eti, domuz eti ve fermente sosis vb.), sebzeler (örneğin lahanası ve turp vb.) ile balık ve deniz ürünleri gibi gıdaların *Listeria* kontaminasyonu ilişkili olduğu bildirilmektedir (Rocourt ve Cossart 1997; Wadud ve ark. 2010).

Halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından diğer önemli bir patojen *Salmonella* spp.'dir. *Salmonella* spp. özellikle kümes hayvanları ve domuz olmak üzere çiftlik hayvanlarında da yaygın olarak bulunmaktadır. Su, toprak, hayvan dışkı, çiğ et, çiğ kanatlı eti, fabrika yüzeyleri, mutfak yüzeyleri ve çiğ deniz ürünleri bu mikroorganizmaların en fazla bulunduğu ortamlardır (FDA 2013). *Salmonella*'nın 2.600'den fazla serotipi olduğu rapor edilmiştir (Guibourdenche ve ark. 2010). *Salmonella*, insanlarda Salmonellozise neden olmakta, hastalık genellikle 4-7 gün sürmekte ve çoğu kişi tedavi olmadan iyileşebilmektedir (CDC 2014). *Salmonella* spp. başta gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere yüksek morbidite ve mortaliteye neden olarak günümüzde küresel bir sorun olarak devam etmektedir (Goburn ve ark. 2007). ABD'de 2000-2008 yılları arasında gıda kaynaklı Salmonellozise bağlı olarak bir milyon hastalanma, 19.000 hastaneye yatış ve 380 ölüm vakası görüldüğü bildirilmiştir (Scallan ve ark. 2011). Avrupa Birliği'nde 2015 yılında 90.000'in üzerinde Salmonellozis vakası rapor edilmiştir (EFSA 2015).

Bu çalışmada, bazı tüketime hazır gıdalarda [n: 235 (et döner, tavuk döner, fermente sucuk, kavurma, beyaz peynir, hoşmerim, helva, rus salatası, sebze salatası)] halk sağlığı ve gıda güvenliği yönünden önem arz eden *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp.'nin yaygınlığı araştırıldı.

MATERYAL ve METOT

Örnekleme

Bu çalışmada, Balıkesir ilindeki farklı marketlerde ve restoranlarda satışa ve tüketime sunulan 235 tüketime hazır gıda (30 adet et döner, 30 adet tavuk döner, 25 adet fermente sucuk, 10 adet kavurma, 50 adet beyaz peynir, 15 adet hoşmerim, 15 adet helva, 20 adet rus salatası, 40 adet sebze salatası) örneği materyal olarak kullanıldı. Sebze salatası (n:40) örnekleri yaklaşık 200 g steril kavanozlara restoranlardan alındı. Diğer örnekler ise (n:195) orjinal ambalajlarında (yaklaşık 100-250 g olarak) marketlerden

satın alındı. Örnekler aseptik şartlarda ve soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve aynı gün analize alındı.

Listeria spp. ve *L. monocytogenes* izolasyonu ve identifikasyonu

Her bir örnekten steril stomacher torbasına 25'er g tartıldı ve üzerine 225 ml Half Fraser Broth (Oxoid, SR166) ilave edilerek stomacherde 2 dk homojenize edilerek 30 °C'de 24±2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası homojenizattan 0.1 ml alındı ve 10'ar ml Fraser Broth (Oxoid, CM0895; SR156) içeren tüplere aktarılarak, 35±2 °C'de 48 ± 2 saat inkübe edildi. Ön zenginleştirme kültüründen bir öze dolusu alınan kültür Oxford Agar (Oxoid CM 856, SR 140) ve PALCAM Agar (Oxoid, CM0877; SR 0150) selektif besiyerlerinin yüzeyine koloniler tek düşecek şekilde ekim yapıldı ve 30°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Aynı şekilde ikinci zenginleştirme besiyerinden birer öze dolusu alınan kültür Oxford Agar ve PALCAM Agar selektif besiyerlerinin yüzeyine koloniler tek düşecek şekilde ekim yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübe edildi. Gelişen *Listeria* şüpheli 3-5 koloni biyokimyasal ve diğer testler yapılmak üzere, Tryptic Soy Agar-Yeast Extract; (TSYEA; Oxoid CM 131) geçildikten sonra petriyer 35±2 °C'de 24 saat inkübe edildi. TSYEA üreyen kolonilere sırası ile Gram boyama, katalaz (%3'lük H₂O₂), oksidaz (Bactident oksidase, Merck 113300) ve 20-25°C'de SIM mediumda (Sulphate Indole Motility Medium; Merck 5470) hareketlilik testleri yapıldı. Gram pozitif, katalaz pozitif, oksidaz negatif ve SIM mediumda oksijenli kısımda üreyerek şemsiye manzarası oluşturan *Listeria* kolonilerinin identifikasyonu amacıyla defibrine koyun kanı ile hazırlanmış %5'lik kanlı agarda β-hemoliz ve CAMP testleri, Microbact *Listeria* 12 L (Oxoid, MB1128) test kiti ve nitrat redüksiyon testleri yapılarak izolatların identifikasyonu gerçekleştirildi. Buna göre kanlı agarda β-hemoliz oluşturan, CAMP testte *S. aureus* ile sinerjik etki göstererek hemoliz veren, biyokimyasal test kitinde L-ramnoz pozitif, D-ksiloz negatif, mannitol negatif ve nitrat redüksiyon testi negatif örnekler *L. monocytogenes* olarak identifiye edildi (ISO 11290-1, 1996).

Salmonella spp. izolasyonu ve identifikasyonu

Her bir örnekten steril stomacher torbalara 25'er g tartıldı ve üzerine 225 ml steril Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS, Oxoid CM1049B) ilave edilerek stomacherde 2 dakika süreyle homojenize edilerek 37±1 °C'de 18±2 saat inkübe edildi. TPS' de ön zenginleştirme yapılan homojenattan 0,1 ml'si 10 ml Rappaport Vassiliadis Broth (RVS(Oxoid CM0669) selektif zenginleştirme besiyerine inoküle edildi ve 41.5 ±1 °C'de 24±3 saat inkübe edildi. Selektif zenginleştirme besiyerinden bir öze dolusu kültür Brilliant Green Phenol Red Agar (BGPR; Oxoid CM 0329; SR0087) ve Xylose Lysine Deoxycholate (XLD Medium; Oxoid, CM 0469)'a çizim yapılarak, 37±1 °C'de 24±3 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu BGPR besiyerinde *Salmonella* spp. için tipik koloniler; pembe-kırmızı nadiren renksiz renkte, çevrelerinde kırmızı bir zon oluşturan ve XLD agar ortamında ise; koloniler merkezleri siyah etrafındaki besiyeri pembe olan kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif olan koloniler Nutrient Agar (Difco, 0001-17)'a saf kültür kontrolleri için ekim yapıldı ve 37 °C'de 24±3 saat inkübe edildi ve Nutrient Agar'da üreyen saf kolonilere önce oksidaz testi uygulandı ve oksidaz negatif olan kolonilere üretici firma talimatına uygun olarak Microbact Gnb 24 E identifikasyon test kiti (Oxoid, MB1130) ile identifikasyon yapıldı (ISO 6579, 2002).

BULGULAR

Balıkesir ilindeki farklı marketlerde ve restoranlarda satışa ve tüketime sunulan toplanan 235 tüketime hazır

gıda örneğinde *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığı araştırıldı. Çalışma sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2'de sunuldu. Çalışmada incelenen toplam 235 tüketime hazır gıda örneğinin 22'sinde (%9.4) *Listeria* spp. ve 5'inde (%2.1) *L. monocytogenes* saptandı. *L. monocytogenes* beyaz peynir ve sebze salatası örneklerinde tespit edildi (Tablo 1).

Balıkesir ilindeki farklı marketlerde ve restoranlarda satışa ve tüketime sunulan toplanan 235 tüketime hazır

gıda örneğinde *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığı araştırıldı. Çalışma sonuçları Tablo 1 ve Tablo 2'de sunuldu. Çalışmada incelenen toplam 235 tüketime hazır gıda örneğinin 22'sinde (%9.4) *Listeria* spp. ve 5'inde (%2.1) *L. monocytogenes* saptandı. *L. monocytogenes* beyaz peynir ve sebze salatası örneklerinde tespit edildi (Tablo 1).

Tablo 1. Tüketime hazır gıdalarda *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* dağılımı

Table 1. Distribution of *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in ready to eat foods

Örnek tipi	Örnek sayısı	<i>Listeria</i> spp. (%)	<i>L. monocytogenes</i> (%)
Et ve Et ürünleri			
Et Döner	30	1(3.3)	0
Tavuk Döner	30	3 (10)	0
Türk Fermente Sucuk	25	0	0
Kavurma	10	0	0
Süt Ürünleri			
Beyaz peynir	50	7 (14)	1(2.0)
Tatlılar			
Höşmerim	15	0	0
Helva	15	0	0
Salatalar			
Rus Salatası	20	1(5)	0
Sebze salatası	40	10 (25)	4(10)
Toplam	235	22 (9.4)	5 (2.1)

Tablo 2. Tüketime hazır gıdalarda *Salmonella* spp. dağılımı

Table 2. Distribution of *Salmonella* spp. in ready to eat foods

Örnek tipi	Örnek sayısı	<i>Salmonella</i> spp. (%)
Et ürünleri		
Et Döner	30	0
Tavuk Döner	30	1(3.3)
Türk Fermente Sucuk	25	0
Kavurma	10	1(10)
Süt Ürünleri		
Beyaz peynir	50	0
Tatlılar		
Höşmerim	15	0
Helva	15	1(6.6)
Salatalar		
Rus Salatası	20	0

TARTIŞMA ve SONUÇ

Tüketime hazır gıdalar mikrobiyal yükü azaltmak ve ortadan kaldırmak için pişirme işlemi uygulanmaksızın tüketilebilen gıdalardır. Bundan dolayı yüksek riskli gıdalar olarak kabul edilmektedir (Ng ve ark. 2013). Günümüzde bu gıdaların giderek popülaritesinin artması ve özellikle mikrobiyolojik kontaminasyon riskinden dolayı tüketicilerde bir endişe oluşturmaktadır (Yang ve ark. 2016). Bu çalışmada analize alınan 235 tüketime hazır gıda örneğinin 22'sinde (%9.4) *Listeria* spp., 5'inde (%2.1) *L. monocytogenes*, 3'ünde (%1.3) *Salmonella* spp. saptandı. Yapılan bu çalışmada 30 adet et ve 30 adet tavuk döner örneğinin sırasıyla 1'inde ve 3'ünde *Listeria* spp. tespit edilirken, örneklerin hiçbirinde *L. monocytogenes* saptanamadı (Tablo 1). Tavuk döner örneklerinde elde edilen değerler Osaili ve ark (2011)'nin değerlerinden (%18.2) düşük bulundu. Aynı araştırmacılar *Listeria* spp.'nin tüketime hazır tavuk eti ürünlerinde yüksek olmasını genellikle işleme ve taşıma sırasında çapraz kontaminasyon ile pişirme sonrası taşıma, parçalama ve paketleme işlem basamaklarında tekrar kontaminasyona bağlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Tüketime hazır gıdalardan 50 beyaz peynir örneğinin 7'sinde (%14) *Listeria* spp., 1'inde (%2) *L. monocytogenes* tespit edildi. Peynir örneklerinin hiçbirinde *Salmonella* spp. tespit edilemedi. Bu çalışmanın sonuçları bazı araştırmacıların sonuçları [Akkaya ve Alişarlı 2006 (%6); Pesavento ve ark. 2010 (%20.0); Pintado ve ark. 2005

(%46); Rodulf ve Scherer 2001 (%6.4)] düşük, Manfreda ve ark. (2005)'nın sonuçları (%2.1) ile uyumlu ve bazı araştırmacıların [Angelidis ve ark. 2006 (%0); Kotzekidou 2013 (%0) sonuçlarından yüksek bulunmuştur. Kasalica ve ark. (2011) süt ve süt ürünleri işleme tesisleri ortam ve şartlarının (nem, organik artıklar, sıcaklık vb.) *L. monocytogenes*'in gelişmesi ve çoğalması için uygun olması ve bu bakterinin ekipman, zemin ve duvarlarda biyofilm oluşturabilmesinden dolayı eliminasyonunun oldukça zor olduğunu rapor etmişlerdir.

Yapılan çalışmada hoşmerim örneklerinde (n:15) *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. saptanamadı. Ancak, Cokal ve ark (2012) yaptıkları çalışmada 100 hoşmerim örneğinin 3'ünde (%3) *L. monocytogenes* tespit etmişlerdir. Bu bakterinin hoşmerime bulaşmasının, üretiminde kullanılan çiğ süttten yapılan tuzlanmamış taze peynirler ile üretim sonrası muhafaza ve satış aşamasında meydana gelebileceği bildirilmiştir (Aydın ve ark. 2009). Diğer yandan bazı araştırmacılar (Aydın ve ark. 2009; Cokal ve ark. 2012) hoşmerim örneklerinde *Salmonella* spp. tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların sonuçları ile hoşmerim örneklerinden elde edilen *Salmonella* spp. sonuçları uyumluluk göstermektedir.

Rus salatası örneklerinin (n:20) 1'inde (%5) *Listeria* spp. tespit edilirken, hiçbirinde *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. saptanamadı. Hampikyan ve ark (2008) yaptıkları çalışmada rus salatası örneklerinde *Salmonella* spp. saptayamadıklarını bildirmişlerdir. Elde edilen bulgular Hampikyan ve ark (2008) bulguları ile benzerlik göstermektedir. Rus salatalarında *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığı ile ilgili az sayıda çalışmaya rastlandı.

Sebze salatası örneklerinin (n:40) 10'unda (%25) *Listeria* spp.; 4'ünde (%10) *L. monocytogenes* tespit edilemedi. Elde edilen bu sonuçlar bazı araştırmacıların [Cordano ve Jacquet 2009 (%15.3); Gülmez ve ark. 2005 (%12.5); Jamali ve ark. 2013 (%14.7); Ponniah ve ark. 2010 (%22.5)] sonuçlarından düşük, bazı araştırmacıların (Balzaretta ve Marzano 2013 (%0); Campos ve ark. 2013 (%0); Christison ve ark. 2009 (%4); Ieren ve ark. 2013 (%1.7); Little ve ark. 2007 (%4.8)] sonuçlarından yüksek bulundu. *Listeria* spp. ve *L. monocytogenes* çevrede yaygın olarak bulunabildiklerinden sebzelere büyüme, hasat, hasat sonrası, hazırlama veya dağıtım esnasında bulaşabilmektedir (Cordano ve Jacquet 2009). Sebze salatalarında *L. monocytogenes*'in bulunması, bu gıdaların çiğ olarak tüketime sunulmalarından dolayı halk sağlığı için önemli bir risk oluşturabilmektedir.

Bu çalışmada 235 tüketime hazır gıda örneğinin 3'ünde (%1.3) *Salmonella* spp. saptandı. *Salmonella* spp. tavuk döner ve kavurma örneklerinde sırasıyla 1'er (%3.3 ve %10) örnekte saptanırken, et döner ve fermente sucuk örneklerinde tespit edilemedi (Tablo 2). Et ve et ürünleri grubunda yer alan örneklerin hiçbirinde *L. monocytogenes* tespit edilemedi. Et dönerlerde Küpeli Gençler ve Kaya (2004); Yalçın ve Can (2013); Yüksek ve ark (2009) *Salmonella* spp. tespit edemediklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacıların bulguları bizim çalışmamızın bulguları ile benzerlik göstermektedir. Diğer yandan bazı araştırmacıların fermente sucuklarda *Salmonella* spp. ve *L. monocytogenes* ile ilgili bulguları [Büyükcünal ve ark. 2016 (%1.52 ve %1.52); Kök ve ark. 2007 (%5 ve %4; Öksüztepe ve ark. 2011 (%3 ve %4)] ile Sancak ve ark (2007)'nın ambalajlanmamış sucuklarda *L. monocytogenes* bulguları (%15) bizim çalışmamızın bulgularından yüksek bulunmuştur. Fermente sucuklarda *Salmonella* spp.

bulunmasının bağırsak kökenli bulaşmaların ve işletme hijyeni ile etin hijyenik kalitesinin kötü olmasından ileri gelebileceği bildirilmiştir (Kök ve ark 2007). *L. monocytogenes* bulunması ise üretim tekniklerindeki farklılık, üretim sonrası kontaminasyon, muhafaza şartları ve yetersiz personel hijyeni ile açıklanmaktadır (Büyükcünal ve ark. 2016). Yine bu çalışmada tavuk döner örneklerinden elde ettiğimiz *Salmonella* spp. sonuçları, bazı araştırmacıların [Gülmez ve ark. 2005 (%0); Hampikyan ve ark. 2008 (%0); Yang ve ark. 2016 (%2.0)] elde ettiği sonuçlardan yüksek ve bazı araştırmacıların [Cardinale ve ark. 2005 (%10.1); Christison ve ark. 2009 (%16)]; sonuçlarından düşük bulundu. Bu çalışmanın *Salmonella* spp. sonuçlarının diğer çalışmaların sonuçlarından düşük bulunması; bölgesel farklılıklar, hijyen koşullarına dikkat edilmesi, çapraz kontaminasyondan kaçınılması ve pişirme işlemi sonrası uygun şartlarda muhafaza edilmesi sayılabilmektedir. Ancak dönerin şiş kalınlığına bağlı olarak, döner matriksinin iç kısımlarındaki sıcaklığın mevcut mikroorganizmaların çoğalmasını destekleyen seviyelerde uzun süre kalması tüketime hazır dönerlerin zaman zaman mikrobiyolojik kalitesinin düşmesine ve patojen mikroorganizmaları içermesine neden olmaktadır (Bostan ve ark. 2011).

Tüketime hazır gıdalardan 15 helva örneğinin 1'inde (%6.6) *Salmonella* spp. saptandı. Anderson ve ark. (2001) Türkiye den ithal edilen tahin helvalarından *S. Typhimurium* DT104 izole ettiklerini bildirmişlerdir. Durlu-Özkaya ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada 93 helva örneğinin 1'inde (%1.07); Ögüt ve Polat (2009) ise 1 helva örneğinde *Salmonella* spp. tespit etmişlerdir. Durlu-Özkaya ve ark. (2004), susamın, tarlada, depolama sırasında, susam içeren gıdaların üretiminde farklı işleme aşamalarında enfekte işçilerle ya da işletmenin hijyenik koşullarına bağlı olarak değişik şekillerde çapraz kontaminasyon yoluyla *Salmonella* ile kontamine olabildiğini bildirmişlerdir.

Sonuç olarak tüketime hazır gıdalar genellikle tüketim öncesi pişirme işlemi uygulanmadan ya da hafif bir ısıtma işlemi sonrası tüketilmektedir. Dolayısıyla bu tip gıdalarda *L. monocytogenes* ve *Salmonella* spp. gibi patojen bakterilerin bulunması halk sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Özellikle üretim basamaklarında uygulanan ısıl işlem yeterli olmalı ve proses sonrası kontaminasyondan kaçınılmalıdır. Salata yapımında kullanılan sebzeler iyi yıkanmalı, çapraz kontaminasyonu engellemek için alet-ekipmanların temizlik ve dezenfeksiyonu yeterli bir şekilde yapılmalı, üretimde çalışan personelin temizlik ve hijyen uyması sağlanmalıdır. Diğer yandan tüketime hazır gıdaların üretimi, işlenmesi, ambalajlanması ve depolama aşamalarında GMP, GHP ve HACCP kurallarına uyulmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Balıkesir Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2013/106 nolu proje ile desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Akkaya L, Alishanlı M (2006). Afyonkarahisar'da tüketime sunulan peynirlerde *Listeria monocytogenes* ve *Salmonella* spp. varlığını belirleme. *YYÜ Vet Fak Derg*, 17(1-2), 87-91.
- Andersson Y, de Jong B, Hellström L, Stamer U, Wollin R, Giesecke J (2001). *Salmonella* Typhimurium outbreak in Sweden from contaminated jars of halva. *Eurosurveillance Weekly*, 5: 010719.

- Angelidis AS, Chronis EN, Papageorgiou DK, Kazakis II, Arsenoglou KC, Stathopoulos GA (2006).** Non-lactic acid, contaminating microbial flora in ready-to-eat foods: A potential food-quality index. *Food Microbiol*, 23, 95-100.
- Aydın A, Aksu H, Taskanal N, Gunsen U (2009).** Microbiological, physicochemical and toxicological quality of traditional Turkish cheese desserts. *J Food Quality*, 32, 590-606.
- Balzaretti CM, Marzano MA (2013).** Prevention of travel-related foodborne diseases: Microbiological risk assessment of food handlers and ready-to-eat foods in northern Italy airport restaurants. *Food Control*, 29, 202-207.
- Bostan K, Yılmaz F, Muratoğlu K, Aydın A (2011).** Pişmiş döner kebaplarda mikrobiyolojik kalite ve mikrobiyel gelişim üzerine bir araştırma. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 781-786.
- Büyükkunal SK, Şakar FŞ, Turhan İ, Erginbaş Ç, Sandıkcı Altunatmaz S, Aksu F et al. (2016).** Presence of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157 and nitrate-nitrite residue levels in Turkish traditional fermented meat products (sucuk and pastırma). *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 22(2), 233-236.
- Campos J, Mourao J, Pestana N, Peixe L, Novais C, Antunes P (2013).** Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. *Int J Food Microbiol*, 166 (3), 464-470.
- Cardinale E, Perrier Gros-Claude JD, Tall F, Guéye EF, Salvat G (2005).** Risk factors for contamination of ready-to-eat street-vended poultry dishes in Dakar, Senegal. *Int J Food Microbiol*, 103: 157-165.
- Carrasco E, Valero A, Pérez-Rodríguez F, García-Gimeno RM, Zurera G (2007).** Management of microbiological safety of ready-to-eat meat products by mathematical modelling: *Listeria monocytogenes* as an example. *Int J Food Microbiol*, 114, 221-226.
- Centers for Disease Control and Prevention (2014).** Braenderup infections linked to nut butter: Clinical Features/Signs and Symptoms. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services. <http://www.cdc.gov/salmonella/braenderup-08-14/signs-symptoms.html>. Erişim Tarihi: 22 Aralık 2015.
- Chan YC, Wiedmann M (2008).** Physiology and genetics of *Listeria monocytogenes* survival and growth at cold temperatures. *Crit Rev Food Sci*, 49, 237-253.
- Christison CA, Lindsay D, Von Holy A (2009).** Microbiological survey of ready-to-eat foods and associated preparation surfaces in retail delicatessens, Johannesburg, South Africa. *Food Control*, 19, 727-733.
- Cokal Y, Dagdelen A, Cenet O, Gunsen U (2012).** Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. *Food Control*, 26(2), 337-340.
- Cordano AM, Jacquet C (2009).** *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable salads sold at supermarkets in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int J Food Microbiol*, 132, 176-179.
- Durlu-Ozkaya F, Levent B, Esen B (2004).** Microbiological investigation of retail helva produced in Turkey, S-F02. 5th World Congress, *Foodborne Infections and Intoxications*, Berlin, 737-740. (7-11 June 2004).
- European Food Safety Authority (2015).** Explains zoonotic diseases: *Salmonella*. <http://www.efsa.europa.eu/2014>, Erişim Tarihi: 15 Kasım 2015.
- Farber JM, Harwig J (1996).** The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*, 7, 253-258.
- Food Drug Administration (2013).** Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. www.fda.gov/tr. Bad Bug Book, Erişim Tarihi: 22 Ağustos 2013.
- Goburn B, Grassl GA, Finlay BB (2007).** *Salmonella*, the host and disease: A brief review. *Immunol Cell Biol*, 85, 112-118.
- Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoletit M, Fields PI, Bockemuhl J, Grimont PAD, et al. (2010).** Supplement 2003-2007 to the whiteKauffmann-Le minor scheme. *Res Microbiol*, 161, 26-29.
- Gülmez M, Sezer Ç, Duman B, Vatansever L, Oral N, Baz E (2005).** Lokantalarda tüketime sunulan bazı gıdaların ve içme sularının mikrobiyolojik kaliteleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 11(1), 5-10.
- Hampikyan H, Ulusoy B, Bingöl EB, Çolak H, Akhan M (2008).** İstanbul'da tüketime sunulan bazı ızgara tipi gıdalar ile salata ve mezelerin mikrobiyolojik kalitelerinin belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 38 (2), 87-94.
- Holah JT, Bird J, Hall KE (2004).** The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains. *J Appl Microbiol*, 97, 68-77.
- Ieren II, Bello M, Kwaga JKP (2013).** Occurrence and antibiotic resistance profile of *Listeria monocytogenes* in salad vegetables and vegetable salads sold in Zaria, Nigeria. *Afr J Food Sci*, 7(9), 334-338.
- ISO 11290-1 (1996).** Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*-Part 1: Detection method. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
- ISO 6579 (2002).** Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Standardization Organization, Geneva, Switzerland.
- Ivanek R, Gröhn Yt, Tauer Lw, Wiedmann M (2005).** The cost and benefit of *Listeria monocytogenes* food safety measures. *Crit Rev Food Sci*, 44(7-8), 513-523
- Jamali H, Chai LC, Thong KL (2013).** Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control*, 32, 19-24.
- Kasalica A, Vuković V, Vranješ A, Memiši N (2011).** *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Biotech Anim Husbandry*, 27(3), 1067-1082.
- Kotzekidou P (2013).** Survey of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* O157: H7 in raw ingredients and ready-to-eat products by commercial real-time PCR kits. *Food Microbiol*, 35(2), 86-91.
- Kök F, Özbey G, Muz A (2007).** Aydın ilinde satışı sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 21(6), 249-252.
- Küpeli Gençer V, Kaya M (2004).** Yaprak dönerin mikrobiyolojik kalitesi ve kimyasal bileşimi. *Türk J Vet Anim Sci*, 28, 1097-1103.
- Lambertz ST, Nilsson C, Brådenmark A, Sylvén S, Johansson A, Jansson LM, Lindblad M (2012).** Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. *Int J Food Microbiol*, 160, 24-31.
- Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K and McLaughlin J (2007).** Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol*, 24,711-717.
- Manfreda G, Cesare De A, Stella S, Cozzi M, Cantoni C (2005).** Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int J Food Microbiol*, 102, 287-293.
- Ng, YF, Wong SL, Cheng HL, Yu PHF, Chan SW (2013).** The microbiological quality of ready-to-eat food in Siu Mei and Lo Mei shops in Hong Kong. *Food Control*, 34(2), 547-553.
- Osaili TM, Alaboudi AR, Ehab A, Nesiari EA (2011).** Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22, 586-590.
- Öğüt S, Polat M (2009).** Bazı beş yıldızlı otellerde hazırlanan gıdaların mikrobiyolojik açıdan değerlendirilmesi. *SDÜ Yaşam Dergisi*, 1(2),12-16.
- Öksüztepe G, Güran HŞ, İncili GK, Gül SB (2011).** Elazığ'da tüketime sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik ve kimyasal kalitesi. *FÜ Sağ Bil Vet Derg*, 25(3),107-114.
- Pesavento G, Ducci B, Nieri D, Comodo N, Lo Nostro A (2010).** Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods. *Food Control*, 21, 708-713.
- Pintado CMBS, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MASS (2005).** Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol*, 22, 79-85.
- Ponniiah J, Robin T, Paie MS, Radu S, Ghazali FM., Kqueen CY, et al. (2010).** *Listeria monocytogenes* in raw salad vegetables sold at retail level in Malaysia. *Food Control*, 21, 774-778.
- Rocourt J, Cossart P (1997).** *Listeria monocytogenes*. In: Doyle, M.P., Buechat, L.R., Montville, T.J. (Eds.), *Food Microbiology-Fundamentals and Frontiers*. American Society for Microbiology (ASM) press, Washington DC, 337-352.
- Rodulf M, Scherer S (2001).** High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol*, 63, 91-98.
- Sancak YC, İşleyici Ö, Sağun E (2007).** Van'da tüketime sunulan bazı et ürünlerinde *Listeria monocytogenes* varlığı. *YYÜ Vet Fak Derg*, 18(1), 93-99.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, Jones JL, Griffin PM (2011).** Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17(1), 7-15.
- Teplitski M, Wrigh AC, Lorca G (2009).** Biological approaches for controlling shellfish-associated pathogens. *Curr Opin Biotechnol*, 20, 185-190.
- Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (2011).** Resmi Gazete Sayısı: 28157 Resmi Gazete Tarihi: 29.12.2011.
- Wadud S, Leon-Velarde Cg, Larson N, Odumeru JA (2010).** Evaluation of immunomagnetic separation in combination with ALOA *Listeria* chromogenic agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Microbiol Methods*, 81, 153-159.

Yalçın H, Can ÖP (2013). Tüketime hazır bazı et yemeklerinin mikrobiyolojik kaliteleri. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 10(1), 1-6.

Yang X, Huang J, Wu O, Zhang J, Liu S, Guo W, Cai S, Yu S (2016). Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control*, 60, 50-56.

Yüksek N, Evrensel SS, Temelli S, Anar Ş, Şen MKC (2009). Microbiological evaluation on the ready-to-eat red meat and chicken doner kebabs from a local catering company in Bursa. *J Biol Environ Sci*, 3, 7-10.



Effect of Different Levels of Feed Consumption on the Quality of Fleece and Number of Fiber Follicles in Norduz Lambs

Selcuk Seckin TUNCER¹ Sema USLU² Cemal BUDAG³
Emre ALARSLAN⁴ Kadir KARAKUS⁵ Turgut AYGUN³

¹ Yuzuncu Yil University, Ozalp Vocational School, Department of Crop and Animal Production, Ozalp, Van, Turkey

² Cumhuriyet University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Histology and Embriology, Sivas, Turkey

³ Yuzuncu Yil University, Faculty of Agriculture, Department of Zootechny, Van, Turkey

⁴ Ministry of Agriculture, Sheep Breeding and Research Station, Bandırma, Balıkesir, Turkey

⁵ Yuzuncu Yil University, Gevas Vocational School, Department of Crop and Animal Production, Gevas, Van, Turkey

Received: 24.02.2016

Accepted: 22.04.2016

SUMMARY

This study examined the effect of different forage levels and ewe's milk consumption levels on the development of fleece characters and number of follicles in Norduz lambs. Fifty Norduz sheep and their 50 lambs were used in the study. Control group lambs freely consumed alfalfa hay until the pasture season and then freely consumed pasture grass. The lambs in the control group also nursed from the ewes for 150 days. The experimental group lambs were fed milk residues for 47 days and consumed test feed after the first week. The lambs in the first, second, and third groups were fed with food consisting 2, 3, and 4% dry matter, respectively, based on their live weights. Skin samples were obtained from animals aged 7 days, 21 days, 2 months, 6 months, and 1 year in order to determine the rates and varieties of fleece follicles. Fleece samples were also obtained from one-year-old animals to determine specific fleece characteristics. The lengths (haut and barb) and strength values of the fleeces were significantly greater in the control group than in the other groups. The effect of forage and breast milk consumption in different levels were not statistically significant in secondary follicle numbers.

Key Words: Norduz, Different feeding, Fleece, Fiber follicle

ÖZET

Norduz Kuzularında Yapağı Kalitesi ve Lif Follikül Sayılarına Farklı Yem Tüketim Düzeylerinin Etkisi

Bu çalışmada, Norduz kuzularında bazı yapağı karakterleri ve lif follikül oluşumu üzerine aynı enerji ve protein içeriğine sahip farklı düzeylerdeki yem ve anne sütü tüketiminin etkisi araştırılmıştır. Hayvan materyali olarak, 50 baş Norduz koyunu ve bunlardan doğan 50 kuzu kullanılmıştır. Kontrol grubundaki kuzular mera dönemine kadar yonca samanı ve mera döneminde de mera otları ile serbest olarak beslenmişlerdir. Ayrıca bu kuzular 150 gün boyunca anne sütü emmişlerdir. Deneme grupları ise 47 gün boyunca kalıntı süt ile beslenmiş ve ilk haftadan itibaren deneme yemleri verilmeye başlanmıştır. Deneme yemi gruplara göre canlı ağırlıkları alınarak ikinci gruba canlı ağırlığının %2, üçüncü gruba %3 ve dördüncü gruba ise %4 kuru madde gelecek şekilde yemleme yapılmıştır. Lif folliküllerinin çeşit ve oranlarını tespit etmek için, kuzular; 7. gün, 21. gün, 2. ay, 6. ay ve 1. yaşa ulaştıklarında deri örnekleri alındı. Ayrıca bazı yapağı karakterlerinin belirlenmesi için de, 1 yaşındaki hayvanlardan yapağı örnekleri alındı. Hauter ve Barbe uzunlukları ile mukavemet değerleri bakımından kontrol grubu hayvanları muamelelere tabi tutulan grupların tümünden daha yüksek değerler almış ve farkların istatistiki olarak önemli olduğu gözlenmiştir. Farklı seviyedeki yem ve süt tüketimi ikincil follikül sayılarında önemli farklar oluşturmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Norduz, Farklı yemleme, Yapağı, Lif follikülleri

INTRODUCTION

In 2015, domestic sheep in Turkey totaled 31.507.934 animals, including 2.205.576 of the Merino breed and 29.302.358 domestic breeds. Approximately 11.5% of the Turkish fleece production (59.376 tonnes) was obtained from Merinos (Turkstat 2016).

The fleece follicles undergo two development stages: occurrence and maturation (Fraser and Short 1960). All primary follicles mature before the birth (Lyne 1961) and create hairs during the 108–110th days of sheep pregnancies (Maddocks and Jackson 1988). Corbett (1979) concluded that it was unlikely that maturation of primary follicles could be affected by undernutrition without also causing the death of the foetus and the dam. No productive breeding strategies in sheep have changed the formation times and arrangements of primary and secondary follicles (Hatcher and Johnson 2004). The primary follicles are characteristically medullated and have coarse fibers (>35 μ m) (Ansari - Renani et al. 2011).

Secondary follicles continue their formation as a triangular structure that is determined by a trio group created by central and side primary follicles during the period from the 85th day of pregnancy until birth (Carter 1955; Hutchison and Mellor 1983). Between the 120–145th days of pregnancy, fiber formation begins (Maddocks and Jackson 1988) and 10–50% of secondary follicles will be in the state where they can produce fiber at birth (Cottle 2006). Short (1955) reported that between the 7–21 days after birth, the period in which matures at the maximum rate of secondary follicles.

Denney et al. (1988) reported that low postnatal nutrition reduced the secondary follicle and total number of follicles per sheep at weaning. Also reduced wool production and quality. The pre-weaning environment is the critical period for development of follicle population.

The secondary follicles are more numerous than primary follicles and produce nonmedullated fine fiber (<35 μ m) (Ansari - Renani et al. 2011).

Genetic factors play an important role in the production and quality of wool and number of follicles of an individual sheep. Heritability of strength fleece between 0.23 and 0.47, fleece efficiency 0.46 and 0.72 (Safari and Fogarty 2003), heritability of wool length 0.48 and fiber diameter 0.57 (Safari et al. 2005), total follicle density h^2 ranges between 0.18 to 0.46 (Hill et al. 1997), depending on the strain of Merino studied. However environmental factors also play an important role quality of wool and number of seconder follicle. Environmental factors can be divided into pre-weaning and post-weaning influences (Hatcher and Johnson 2004). The aim of this study was to investigate the effect of different weaning strategies and the amount of forage consumption, given the same protein and energy content, on specific fleece characters and secondary fleece follicle formation in the Norduz sheep breed.

MATERIALS and METHODS

The study conducted on the Yuzuncu Yil University Research and Application Farm in 2010.

After birth, 50 lambs were divided into four groups. The control group did not undergo the foraging program applied to the other three groups. They were kept with the ewes in the main and pasture seasons. They consumed alfalfa hay until the pasture season and then freely consumed pasture grass. Forage grasses have a low value in the pasture. The lambs in this group nursed from the ewe

for 150 days. In the experimental groups, the lambs were weaned on the 47th day and then fed milk residues. Lambs in the trial groups began to consume feed after the first week. Dry matter intake is a key determinant of growth. Lambs consume, on average, 3.8–4.2% of their live weight daily on a 'dry matter' basis (Goers and Jolly 2007). Therefore, the lambs in the 1st group were fed feed consisting of 2% dry weight based on dry weight, while the second and the third groups were fed feed consisting of 3 and 4% dry matter, respectively, based on live weight.

Dry fescue and lamb growth forage given in Table 1 were formulated based on a rate of 1:3 (25%:75%) for the lamb diets (Sarı et al. 2008). The groups were fed with dry material to allow determination of changes in protein and energy levels. The mixture of dry fescue and lamb growth forage was provided twice daily, in the morning and in the evening. Fresh and clean water was provided for the animals.

Table 1. Composition and nutrient content of the feed used in research

Lamb growth forage		Dry fescue	
Feed ingredient	%	Feed ingredient	%
Cottonseed meal	32.0	Grasses	50
Corn	23.0	Pulp	30
Barley	10.0	Bran	10
Wheat	15.0	Others	10
Bran	10.0		
Molasses	7.0		
Di calcium phosphate	1.5		
Mineral	1.0		
Vitamin	0.2		
Salt	0.5		

When the lambs reached one year of age, one palm-sized fleece area was removed and the fleeces were kept in labelled paper bags. The remaining fleeces, after shearing, were cut out with a razor blade without damaging the epidermis. When the lambs were 7 days, 21 days, 2 months, 6 months, and 1 year old, a piece with a Mean Fiber Diameter of 0.5 cm was taken from the skin with normal tension from a location on the last rib of the right side section with the help of a scalpel.

The mean fiber diameter, haut and barb length, efficiency, strength, and elasticity determinations of the fleece samples from an old yearling were performed at the Lalahan Livestock Research and Development Center.

Histopathological examinations were conducted on tissue samples with mean fiber diameters of 0.5 cm, obtained after sterilization of the shaved parts located at the last rib on the right side of the sheep at age 1 week, 21 days, 2 months, 5 months, and 1 year. The collected tissue samples were fixed in 10% buffered formalin for 24–48 hours. After fixation, they were embedded in Paraplast parallel to the epidermis surface using routine histologic tissue technique. Sections 6–7 μ m thick were made from the prepared blocks and stained with Mallory Trichrome Stain (Bancroft and Cook 1984). The numbers and ratios of primary and secondary follicles were determined and their distribution in mm² was obtained by ocular micrometry in 100 frames using 20x lenses. The relevant areas were photographed.

Descriptive statistics for the properties were expressed as averages and standard errors. One-way analysis of variance and one or two-factor variance analyses were used for comparison of the groups and time. Following analysis of variance, a Duncan multiple comparison test was used to compare the different groups and times. The Spearman correlation coefficient was calculated to determine the relationship between the properties. The statistical significance level was taken as 5% in the calculations and the SPSS (Ver: 13) software package was used for all calculations.

RESULTS and DISCUSSION

Live weight in Norduz lambs

Differences in live weight between control and treatment groups are shown in table 2.

The live weights at six months were significantly higher in the control group than in the experimental group ($P < 0.01$) (Table 2). The higher live weights in the control group were explained by the weaning date (150th day). The live weights of the treatment groups in this period were compatible with the differences in the feeding amounts.

Fleece characters in Norduz lambs

Statistical values related to the fleece properties of 1 year old Norduz lambs are given in Table 3.

No statistical differences were found in terms of mean fiber diameter, elasticity, or efficiency values.

Haut lengths were determined as 42.40, 30.45, 30.93, and 32.82 mm for the control group, group I, group II, and group III, respectively, while the barb lengths were 65.30, 51.70, 47.55, and 49.38 mm and the strengths were determined as 40.81, 25.79, 24.40, and 24.6 g, respectively. Higher live weights were observed in the control group (Table 3), as were greater lengths (haut and barb) and strengths in terms of fleece characteristics. These results were comparable to those found in the literature (Özcan 1971), which also indicated statistically higher values for control animals in terms of haut, barb and strength values. No differences were observed in terms of fleece properties between the trial groups ($P < 0.05$).

The mean fiber diameters values in the control group and group III were similar to those reported by Çivi (1999) for Karakas sheep, by Karakuş et al. (2005) for Karakas and Norduz sheep, by Ünal et al. (2004) for Akkaraman sheep, and by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz and Karakas breeds. The mean fiber diameter value reported by Çivi (1999), again for Norduz sheep, was thicker than that for the fleeces of all groups in our study. The mean fiber diameter values found by İmik et al. (2003) and Aytaç (2004) for Akkaraman were similar to that reported in the present study for group I and group II Norduz sheep and thinner than that of group III.

The haut lengths of the control group was quite long from the treated Norduz groups and was longer than the values reported by İmik et al. (2003) and Aytaç (2004) for Akkaraman sheep, but was similar that reported by Ünal et al. (2004). It was also higher than the value reported by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz and Karakas sheep. Similarly, the barb length of the control group, which was significantly longer than that of the other groups in the present study, was also longer than the values reported for Norduz and Karakas sheep (Tuncer and Cengiz 2009) and Akkaraman sheep (İmik et al. 2003; Aytaç 2004; Ünal et al. 2004).

The average fleece elasticity was higher in the control group than in the other 3 groups in the present study. The average elasticity of all groups in the study was lower than the values reported by Çivi (1999) for Karakas and Norduz sheep. The fleece elasticity ratios of all Norduz groups studied were similar to the value found by İmik et al. (2003) for Akkaraman sheep and higher than that reported by Ünal et al. (2004). The fleece elasticity average for the Norduz control group in the present study was similar to the value reported by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz sheep and higher than the value reported for Karakas sheep. The elasticity values of for the three treated Norduz sheep groups were lower than the value reported by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz, but were similar to the values reported for Karakas sheep.

The fiber strength value was higher for the control group than for the average value of all three trial groups. The fiber strength values of the trial groups in this study were similar to the value reported by Çivi (1999) for Karakas sheep, while the value for the Norduz control group was similar to the fiber strength value determined by Çivi for Norduz sheep. In addition, fiber strength values of all groups used in the study were substantially higher than the values reported in the studies of Norduz and Akkaraman sheep (Aytaç 2004; Ünal et al. 2004; Karakuş et al. 2005; Tuncer and Cengiz 2009).

Fleece follicle number in Norduz lambs

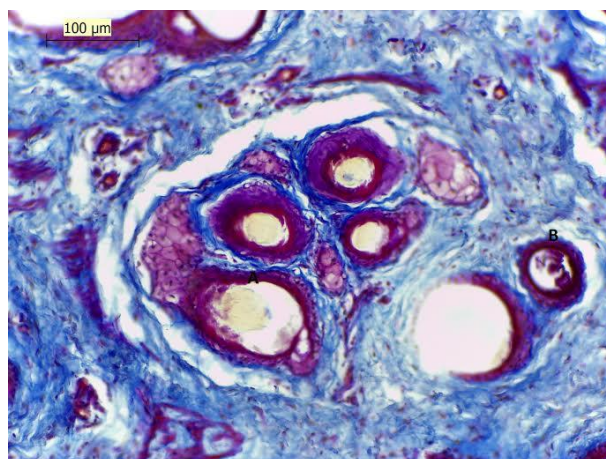


Figure 1. Norduz skin, 10% TF, triple staining, A: Primary follicular, B: Secondary follicular.

Primary follicle number: The numbers of primary follicle per 1 mm² skin surface of Norduz lambs subjected to different levels of forage consumption, but containing same energy and protein levels, are given in Table 4.

Primary follicle number of 7th day old control group of Norduz and group I was found to be higher but statistically insignificant than the primary follicle number in the same period of Norduz group II and group III. However, this difference was not detected from the skin sections obtained from 21 days old lambs. This may be caused by the death of lambs.

No statistically significant differences were observed among the groups in terms of primary follicle numbers. This is an agreement with the previous reports by the others (Lyne 1961, Maddocks and Jackson 1988, Corbett 1979).

The primary follicle number of all groups in this study was somewhat higher than the value determined by Zik et al. (1999) for Karakas sheep. The primary follicle number determined by Kocamış and Aslan (2004) for Tuj sheep was higher than the average values of all 1-year-old Norduz groups in the present study. The primary follicle numbers

obtained in Norduz sheep in this study were higher than the values determined by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz and Karakas sheep. The primary follicle numbers of Norduz sheep were higher than those of Iranian Afshari, Zandi,

Mehrabani, Lori and Balouchi sheep (Ansari -Renani et al. 2011).

Secondary follicle number: The number of secondary follicles is given in Table 5.

Table 2. The average live weight of Norduz lambs at birth and after specific days of nutrition (kg)

	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$			
	Control group	I. group	II. group	III. group
Birth	4.51±0.45	4.60±0.20	4.48±0.60	4.40±0.86
7 th day	6.71±0.80	6.40±0.20	6.37±1.58	6.60±1.10
21 th day	9.0±1.37	9.30±0.9	9.17±1.97	9.37±1.38
1 th month	10.54±1.64	10.81±1.02	10.67±2.05	11.72±1.29
2 th month	16.54±1.94	16.0±2.16	15.32±2.99	17.14±2.07
6 th month	40.52±5.94a [#]	28.32±3.15c	31.68±3.45bc	35.97±2.17ab

[#] Different letters within the same line are significantly different.

Table 3. Fleece characteristics in Norduz groups

	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$			
	Control group	I. group	II. group	III. group
Haut Length (mm)	42.40±4.46a [#]	30.45±3.26b	30.93±1.62b	32.82±2.12b
Barb Length (mm)	65.30±2.36a	51.70±2.12b	47.55±3.22b	49.38±2.64b
Mean Fibre Diameter (μ)	33.58±2.99	29.05±0.88	27.30±1.55	31.12±1.29
Elasticity (%)	37.51±2.87	34.88±1.63	30.64±3.12	30.41±1.95
Strength (g)	40.81±7.35a	25.79±3.51b	24.40±3.07b	24.61 ± 2.31b
Efficiency (%)	64.15±4.15	54.63±8.26	62.35±2.03	51.67±5.87

[#] Different letters within the same line are significantly different

Table 4. The number of primary follicles in Norduz groups

	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$			
	Control group	I. group	II. group	III. group
7 th day	14.65±1.03	12.00±1.99	9.86±2.37	8.00±1.41
21 th day	5.00±0.58	7.64±3.00	8.65±1.03	7.32±0.39
2 th month	5.77±0.23	7.65±0.80	6.95±0.80	5.11±1.11
6 th month	6.21±0.89	5.64±1.00	8.43±1.60	5.99±0.67
1 year	6.00±0.052	5.23±0.39	6.38±1.10	5.50±0.36
p _{group} = 0.613		p _{time} = 0.341		p _{group x time} = 0.457

Table 5. The number of secondary follicles in Norduz groups

	$\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$			
	Control group	I. group	II. group	III. group
7 th day	34.65±1.68	33.49±2.80	25.32±7.31	30.66±3.32
21 th day	25.09±4.23	26.43±3.47	26.44±4.29	28.82±5.45
2 th month	19.55±0.45	21.15±2.22	20.36±3.96	23.55±2.12
6 th month	18.88±2.56	19.98 ±2.66	27.76±4.60	25.76±1.55
1 year	18.65±2.33	21.48±2.53	24.43±2.32	23.52±1.28
p _{group} = 0.648		p _{time} = 0.331		p _{group x time} = 0.235

Table 6. Spearman correlation coefficients between the fleece properties and fleece follicles numbers

	HU (mm)	BU (mm)	MF Diam. (μ)	Elast. (%)	Str. (g)	Effic. (%)	Primer follicle					Seconder follicle							
							7 th day	21 th day	2 th month	6 th month	1 year	7 th day	21 th day	2 th month	6 th month	1 year			
HU (mm)	1																		
BU (mm)	.925**	1																	
MF Diam. (μ)	.338	.211	1																
Elast. (%)	.439	.455	.665**	1															
Str. (g)	.448	.393	.668**	.816**	1														
Effic. (%)	.299	.229	.032	.387	.229	1													
Primer follicle	7 th day	.370	.579*	.482	.516	.178	.086	1											
	21 th day	-.608	-.456	-.729*	-.578	-.340	-.395	-.636*	1										
	2 th month	-.294	.000	-.521	-.202	.034	-.345	-.320	.610*	1									
	6 th month	-.062	-.455	-.577	.455	.577	.152	-.231	.154	.154	1								
	1 year	-.213	-.270	-.229	.142	.146	.586	-.013	.102	.196	.761*	1							
Seconder follicle	7 th day	.072	.308	.385	.500	.082	.104	.814**	-.333	-.451	-.259	.104	1						
	21 th day	-.117	-.059	-.494	-.527	-.050	-.745*	-.634*	.650*	.535	-.718	-.540	-.578	1					
	2 th month	-.529	-.521	-.202	-.277	.235	-.445	-.671*	.767**	.481	-.816	.081	-.640*	.569	1				
	6 th month	.360	-.036	-.286	-.429	-.286	-.072	-.222	-.400	-.400	.508	-.060	-.286	-.600	-.718	1			
	1 year	.080	-.287	-.032	-.178	-.041	.392	-.456	-.198	.099	.261	.436	-.498	-.333	.314	.536	1		

*: P<0.05, **: P<0.01 HU: Haut Length, BU: Barb Length, MF Diam.: Mean Fiber Diameter, Elast.: Elasticity, Str.: Strength, Effic.: Efficiency

The secondary follicle numbers obtained on day 7 was higher for the control and group I (34.65 and 33.49, respectively) but the differences were not statistically significant.

As observed with the primary follicles, the secondary follicle numbers observed in the control and group I were higher at day 7 than at day 21 or at 2 and 6 months or 1 year, but the differences were not statistically significant. Previous studies (Short 1955, Denney et al. 1988) concluded that low postnatal nutrition reduced the secondary follicle. But the primary follicles were not affected by dietary differences in this study. The reason for this can be explained as; the effect of forage and breast milk consumption in different levels were not statistically significant in secondary follicle numbers.

In this study, secondary follicle numbers of all 1-year-old Norduz sheep in all groups were somewhat lower or higher than the ones reported by Zik et al. (1999) for Karakas sheep and quite higher than the values reported by Tuncer and Cengiz (2009) for Norduz and Karakas sheep. The results of the present study indicate that the secondary follicle number of Norduz sheep was higher than the value determined by Ansari-Renani et al. (2011) for Afshari, Zandi, Mehrabani, Lori and Balouchi breeds.

Correlation between fleece properties and follicle numbers in Norduz lambs

The correlation between fleece properties and follicle numbers in the Norduz groups based on different feed amounts, but the same energy and protein content, are shown in Table 6.

The barb lengths (P< 0.01) increased significantly, with high haut length. A significant positive relation was observed between barb lengths and the primary follicle number at day 7 (P<0.05). Statistically significant increases in mean fiber diameter, elasticity, and strength were also observed (P<0.01) and the primary follicle number of 21-day-old Norduz lambs decreased significantly (P<0.05). A significant positive relationship was found between fleece

elasticity and fleece strength (P<0.01). The fleece efficiency and the secondary follicle number showed a statistically significant negative correlation (P<0.05) in 21-day-old lambs.

The primary follicle numbers between 7-day-old and 21-day-old Norduz lambs showed a significant negative relationship (P<0.05) in the present study, while significant positive correlation was found among the primary follicle and secondary follicle numbers of 7-day old (P<0.01). A significant negative correlation (P<0.05) was observed between secondary follicles of 7-day-old and 2-month-old Norduz lambs, while a significant positive relationship was found for primary follicles between 21-day-old and 2-month-old lambs (P<0.05), another significant positive relationship was found between primary and secondary follicles of 21-day-old lambs (P<0.05). Positive significant relationship was determined between primary follicles of 21-day-old and secondary follicles of 2-month-old lambs (P<0.01). The increase in primary follicles of 6-month-old Norduz lambs resulted in a significant increase in primary follicles in 1-year-old Norduz lambs (P<0.05). A significant negative relationship (P<0.05) was observed between primary follicles of 7-day-old and secondary follicles of 2-month-old Norduz lambs.

CONCLUSION

The absence of a statistical difference between trial groups indicates that feed amount has no significant effect on fleece characteristics. In contrast, the fleeces of the experimental groups and the control group showed significant differences in terms of the strength and length of haut and barb. This may be explained by the different weaning periods between the trial and the control groups. The maturation of the primary follicles before the birth (Lyne 1961) meant that the primary follicles were not affected by dietary differences in this study. The secondary follicles were also similar in all groups. This situation can be explained by the possibility that the nutritional levels of the groups were not sufficiently different. If the nutrition of the

groups had been more dissimilar (different feed content), differences might have been observed in the number of secondary follicles. In conclusion, small differences in nutrition levels are not expected to change the secondary follicles and fleece properties of Norduz lambs.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by Research Fund of the Yuzuncu Yil University. Project Number: 2009-ZF-B041.

REFERENCES

- Ansari-Renani HR, Moradi S, Baghershah HR, Ebadi Z, Salehi M, Seyed Momen SM, Ansari-Renani MY (2011).** Determination of wool follicle characteristics of Iranian sheep breeds. *Asian-Australas J Anim Sci*, 24 (8),1173-1177.
- Aytaç M (2004).** Akkaraman, Sakız x Akkaraman F₁ ve G₁ ile Kıvrıkcık x Akkaraman F₁ ve G₁ Genotiplerinde Verim Özellikleri. Ankara Univ Fen Bil Enst, (PhD Thesis), Turkey.
- Bancroft JD, Cook HC (1984).** Manual of Histological Techniques. Churchill Livingstone, London.
- Carter HB (1955).** The hair follicle group in sheep. *Anim Breed Abstr*, 23 (2), 101-116.
- Corbett JL (1979).** Variation in wool growth with physiological state, in: JL Corbett (ed.) Physiological and environmental limitations to wool growth, pp. 79-98, Armidale, Australia, The University of New England Publishing Unit
- Çivi A (1999).** Karakaş ve Norduz Kuzularında Yapağı Verim ve Özellikleri. Yüzüncü Yil Üniv Fen Bil Enst (PhD Thesis), Turkey.
- Cottle D (2006).** Animal fibres, follicles and fleeces. <http://www.personal.une.edu.au/~dcottle2/211-lecture2.pdf>. Accessed: 22 June 2006.
- Denney GD, Thornberry, KJ, Sladek MA (1988).** The effect of pre and postnatal nutrient deprivation on live weight and wool production of single born Merino sheep. *Proc Aust Soc Anim Prod*, 17, 174-177.
- Fraser AS, Short BF (1960).** The biology of the fleece. Anim Res Laboratories Techn Paper 3. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Melbourne, Australia.
- Goers H, Jollys S (2007).** Meat and Livestock Australia. ISBN: 9 7817 4191 1060, Australia.
- Hatcher S, Johnson PR (2004).** Optimising genetic potential for wool production and quality through maternal nutrition. AFBM Network Conference, Orange NSW 2800, Australia.
- Hill JA, Hynd PI, Ponzoni RW, Grimson RJ, Jaensch, KS, Kenyon RV and Penno NM (1997).** 'Skin and follicle characters 1. Heritabilities and correlations among them', in Proceedings of the Australian Association for Animal Breeding and Genetics, *Aust Assoc Anim Breeding and Genetics*, 12, 520-523
- Hutchison G, Mellor DJ (1983).** Effects of maternal nutrition on the initiation of secondary wool follicles in foetal sheep. *J Comp Pathol*, 93 (4), 577-583.
- İmik H, Tuncer ŞD, Aytaç M, Aylanç A (2003).** Akkaraman kuzu rasyonlarına arpa yerine farklı oranlarda katılan kavuzu alınmış süpürge darısının (*Sorghum vulgare*) besi performansı ve yapağı kalitesi üzerine etkisi. *Türk Vet Hayv Derg*, 27, 351-360.
- Karakuş K, Tuncer SS, Arslan S (2005).** Comparison of the fleece characteristics of Karakas and Norduz sheep (Local Ewes in Turkey). *J Anim Vet Adv*, 4 (6), 1-10.
- Kocamış H, Aslan Ş (2004).** Tuj koyunlarının derileri üzerine histolojik ve histometrik bir inceleme. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 10 (1), 91-98.
- Lyne AG (1961).** The postnatal development of wool follicles, shedding and skin thickness in inbred Merino and Southdown-Merino crossbred sheep. *Aust J Biol Sci*, 14, 141-156.
- Maddocks IG, Jackson N (1988).** Structural studies of sheep, cattle and goat skin. CSIRO Division Animal Production, Blacktown, New South Wales, Australia.
- Özcan H (1971).** İnanlı İnehanesi Kıvrıkcık koyunlarında canlı ağırlık, yapağı verimi, lüle uzunluğu ve yapağı inceliğinin kalıtım dereceleri ve bu yapağı karakterleri arasındaki ilişkiler *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 18 (2), 149-161.
- Özfiliz N, Özer A, Yakışık M, Erdost H (1997).** Kıvrıkcık ve Karacabey Merinos koyunlarının derilerinin histolojik ve morfometrik yönden karşılaştırılması olarak incelenmesi. *Türk J Vet Anim Sci*, 21, 125-133.
- Safari A and Fogarty NM (2003).** Genetic parameters for sheep production traits: Estimates from the literature, NSW Agriculture, Orange.
- Safari E, Fogarty NM, Gilmour AR (2005).** A review of genetic parameter estimates for wool, growth, meat and production traits in sheep. *Livest Prod Sci*, 92 (3), 271-289.
- Sarı M, Bolat D, Çerçi İH, Önel AG, Deniz S, Azman MA, Şahin K, Güler T, Seven PT, Karşlı MA, Şahin N, Nursoy H, Çiftçi M, Bingöl NT (2008).** Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. ISBN: 978-975-6676-29-5, Malatya.
- Short B. (1955).** Development of the secondary follicle population in sheep. *Aust J Agr Res*, 6 (1), 62-67.
- Tuncer SS, Cengiz F (2009).** Norduz ve Karakaş Koyunlarında Kıl Follikülü ile Yapağı Özellikleri Arasındaki İlişkiler. 6. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, Poster sunumu, Erzurum.
- Turkstat (2016).** Turkish Statistical Institute, Livestock Statistics. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/hayvancilikapp/hayvancilik.zul>. Accessed: 01 April 2016.
- Ünal N, Akçapınar H, Atasoy F, Koçak S, Aytaç M (2004).** Akkaraman, Sakız x Akkaraman ve Kıvrıkcık x Akkaraman melezleri (F₁, G₁) ile Karayaka ve Bafra koyunlarda canlı ağırlık ve yapağı özellikleri. *Lalahan Hayv Araşt Enst Derg*, 44 (2), 15-22.
- Zık B, Özfiliz N, Erdost H, Yağcı A (1999).** Karayaka koyun derileri sırt bölgesinin histolojik ve morfometrik yönden incelenmesi. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, 5 (2), 193 - 201.



Uses of Proteolytic Enzymes on Treatment and Effects on Cow's Mastitis Treatment

Onder AYTEKİN

Firat University, Health Services Vocational School, Elazig, Turkey

Received: 10.02.2015

Accepted: 09.04.2015

SUMMARY

Proteolytic enzymes are hydrolase enzymes which can be used for treatment. They have important roles like control and regulation in homeostasis process. Proteolytic enzymes have been used as a holistic-alternative treatment method in veterinary practice. Nowadays, the researches about proteolytic enzymes have been concentrated on mastitis and endometritis of ruminants in veterinary medicine. It's emphasized that proteolytic enzymes are an option on supportive treatment in researches. The effects on mastitis treatments were interesting.

Key Words: Proteolytic enzymes, Holistic therapy, Veterinary, Supportive treatment, Mastitis

ÖZET

Proteolitik Enzimlerin Tedavide Kullanımı ve İneklerde Mastitis Tedavisindeki Etkileri

Proteolitik enzimler tedavi amacıyla kullanılabilen hidrolaz enzimlerdendir. Proteolitik enzimler, homeostazis sürecinde kontrol ve regülasyon gibi önemli rollere sahiptirler. Proteolitik enzimler veteriner pratikte, holistik-alternatif tedavi yöntemi olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde, veteriner hekimlikte proteolitik enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar özellikle ruminantlarda mastitis ve endometritis üzerinde yoğunlaşmıştır. Proteolitik enzimlerin olumlu etkileriyle tedaviye destek amacıyla kullanılacak bir seçenek olduğu yapılan araştırmalarda vurgulanmıştır. Mastitis tedavilerindeki etkileri ilgi çekicidir.

Anahtar Kelimeler: Proteolitik enzim, Holistik tedavi, Veteriner, Destekleyici tedavi, Mastitis

GİRİŞ

Proteolitik enzimler tedavi amacıyla kullanılabilen hidrolaz enzimlerdendir. Proteaz, proteinaz ve peptidaz olarak da adlandırılan proteolitik enzimler, proteinleri parçalama fonksiyonuna sahiptirler (Desser 2007e). Proteolitik enzimler, kompleks molekülleri basit moleküllere parçalama şeklindeki sindirim faaliyetlerinin yanı sıra, vücudun uyum içerisinde tutulmasını sağlayan birçok sürecin kontrolü ve regülasyonunda önemli rol alırlar (Desser 2007e; Anonymus 2010).

Proteolitik enzimler vücut hücrelerinden (endojen) ve alınan gıdalardan (eksojen) sağlanırlar. Yaşın ilerlemesiyle hücrelerin ürettiği endojen enzim miktarı ve gıda kaynaklı enzimlerin bağırsaklardan emilimi azalmaktadır. Ayrıca günümüzde birçok olumsuz faktör endojen enzim üretiminde aksaklıklara yol açmaktadır. Bu durum eksojen enzim takviyesini gerekli kılmaktadır (Desser 2007f; Bowler 2010).

Tedavide sık olarak kullanılan proteolitik enzimler; Bromelain, Papain, Ficin, Nattokinaz, Serrapeptidaz, Tripsin, Kimotripsin ve Pankreatin'dir (Desser 2007a).

Proteolitik enzimler veteriner pratikte, holistik-alternatif tedavi yöntemi olarak, cerrahide, yara tedavilerinde, kas-iskelet yangılarında, immunomodülasyonda, sindirim bozukluklarında, kanserden korumada, eklem hastalıklarında, deri-kıl bozukluklarında, alerjilerde, lokal mantar enfeksiyonlarında ve detoksifikasyon amacıyla sıkça kullanılmaktadır (Percival 1999).

Günümüzde, veteriner hekimlikte proteolitik enzimlerle ilgili yapılan araştırmalar çoğunlukla ruminantlarda mastitis ve kısmen de endometritis üzerinde yoğunlaşmıştır.

PROTEOLİTİK ENZİM TEDAVİSİNİN TARİHÇESİ

Proteolitik enzim tedavisi, kökenini naturopatiden alan bir tedavi formudur (Anonymus 2010). Yapılan çalışmalar genellikle klinik enzimolojinin bir alanı olan pankreatik

enzimlerin medikal kullanımı üzerinde odaklanmıştır. Pankreatik enzimler uzun tarihçeleri boyunca, başlangıçta ham karışımlar şeklinde kullanılmış, daha sonra teknolojinin gelişimiyle saflaştırılmış formda kullanılmaya başlanmıştır (Scheidlin 2007).

1900'lü yılların başında pankreastan (pankreatin) elde edilen proteolitik enzim ekstraktları, bazı kanserlerin tedavisinde, John Beard tarafından damar içi ve tümör içine verilme şeklinde kullanılmıştır. Bu uygulama tümör gelişimini kısmen durdurmuştur (Anonymus 2010; Bowler 2010). Beard'ı sonradan takip eden Max Wolf, enzimlerin nasıl stabil hale getirilebileceği üzerinde çalışmalar yapmıştır. Wolf ve Benitez'in uzun süren çalışmaları ve deneyleri sonucu proteolitik enzimler optimize edilmiş, sinerjistik kombinasyonları geliştirilmiş, akut ve kronik enfeksiyonlar, ödem ve viral enfeksiyonların tedavisi için uygun oldukları ortaya çıkmıştır (Desser 2007c; Bowler 2010). Max Wolf'un araştırmalarıyla başlayan proteolitik enzim tedavisinin modern çağı günümüzde de devam etmektedir. Avrupa'da gerçekleştirilen klinik araştırmalar proteolitik enzimlerin tek başlarına, kendi aralarında kombinasyonlarla ve antibiyotiklerle kombine edilerek kullanımının tedavide olumlu sonuçlara ulaştığını göstermektedir (Desser 2007b; Lenard 2010).

Proteolitik enzimler tıbbi obstetri ve jinekolojide; kronik ürogenital enfeksiyonlar, abortuslar, reproduktif bozukluklar, endometriozis, jinekolojik cerrahi, genital enfeksiyonlarda immunomodülasyon, meme kanseri, infertilite, mastopatiler ve mastitislerin tedavisinde kullanılmaktadır. Proteolitik enzimlerin insanlarda mastitis tedavisinde kullanılmasıyla ilgili çalışmalar (Ermiglia 1959; Dessarzin ve ark. 1961; Leppanen 1961; Grigorian ve ark. 1974; Tambiev 1977; Gostishchev ve Tambiev 1978; Khanin ve Tambiev 1979; Storozhuk ve ark. 1984-1985; Storozhuk ve Babich 1986) bildirilmiştir.

Proteolitik enzimlerin veteriner hekimlikte kullanımı uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Charles W. Raker, "Use of Enzymes in Veterinary Medicine (1957)" başlıklı yayınında, proteolitik enzimlerin veteriner hekimlikte enfeksiyöz ve non-enfeksiyöz hastalık süreçlerinde tedaviye katkıları olduğunu bildirmiştir. Raker, konvansiyonel tedaviye yeterince cevap vermeyen inatçı vakalarda, enzimlerin kullanılmasında cevabın daha hızlı geliştiğini belirtmiştir. Ayrıca, yangısal durumlarda enzimlerin iyileşme safhasını kısalttığı ve antibiyotik ajanlara daha iyi bir cevabın geliştiğinden bahsetmektedir. Charles W. Raker, Drury ve Bixler isimli araştırmacıların akut ve kronik sığır mastitislerinin tedavisinde proteolitik (pankreatik) enzimleri kullandıkları ve olumlu sonuçlara ulaştıklarını belirtmiştir (Raker 1957).

Veteriner pratikte proteolitik enzimlerin tedavide kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalar, özellikle ruminantlarda mastitis ve endometritis üzerinde yoğunlaşmıştır. Mastitiste proteolitik enzim tedavisiyle ilgili yapılan çalışmalarda (Dunkel 1967; Prosandeev 1990; Zander 1997; Muhammad ve ark. 2000; Bake ve Illek 2006; Contreras ve ark. 2009) elde edilen olumlu sonuçlar dikkat çekmektedir. İneklerde endometritiste proteolitik enzim tedavisiyle ilgili çalışmalar da (Anyulis 1989; Marushka 1989; Shelyugina ve ark. 1989; Anyulis 1991; Biziuievichius ve Lukauskas 1998; Drillich ve ark. 2005) bulunmaktadır.

PROTEOLİTİK ENZİM TEDAVİSİNİN ÖNEMLİ ETKİLERİ

Antienflamatuar Etkileri

Hayvanlar üzerinde yapılan bazı çalışmalar proteazların pro-enflamatuar prostaglandinlerin sentezini inhibe ettiğini göstermiştir (Percival 1999). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, akut ve subakut yangılarda kimotripsin, tripsin ve serratiopeptidazın antienflamatuar etkinliğe sahip olduğu bildirilmiştir (Viswanatha Swamy ve Patil 2008). Proteolitik enzimler, plazma proteinlerini ve yangısal doku atıklarını yıkımlayarak, uzaklaştırılmasında ve fagositozunda yardımcı olarak şişkinliğin çözülmesini sağlarlar. Bunun sonucu olarak ağrının ortadan kalkmasıyla rahatlama ve basıncın hafiflemesiyle ödemde azalma meydana gelmektedir (Anonymus 2010; Bowler 2010).

Proteolitik enzimlerin analjezik etkisinin, bradikinin ve prostaglandin gibi yangı mediyatörleri sentezinin engellenmesiyle oluştuğu düşünülmektedir (Anonymus 2010; Bowler 2010). Başka bir teoriye göre ise, tripsin gibi peptidazlar antienflamatuar ajan olarak rol almasalar da yangısal süreci oldukça hızlandırarak, ağrı süresinin kısaltılmasını sağlamaktadırlar (Anonymus 2010). Yapılan çalışmalara göre enzim uygulanan hastalar plasebo gruplarıyla kıyaslandığında, enzim uygulanan gruplarda belirgin olarak ağrı ve enflamasyonda azalma ve daha hızlı bir iyileşme oranı görülmüştür (Percival 1999).

Proteolitik enzimler, günümüzde kullanılan en güçlü fibrinolitiklerdir (Bowler 2010). Fibrin pıhtıları oluştuğu zaman, organizmanın kendi fibrinolitik ajanı olan plazmin (endojen proteaz) fibrin bariyerini kırar. Fibrin bariyeri kırıldıktan sonra travmaya cevap veren karaciğer, akut faz reaktantları (APR) salarak plazmin ve fibrinolitik aktivitesini inhibe eder (Anonymus 2005). Plazmini aktive eden tripsin ve kimotripsin, fibrinolitik etkiye katkıda bulunup (Percival 1999; Anonymus 2005), dolaşımı düzenleyerek; ödem, hematoma ve ağrıyı giderirler. Fibrinolizisin oluşumuyla, atık doku döküntüleri ve nekrotik dokuların uzaklaştırılması amacıyla fagositoz teşvik edilir ve iyileşme süreci hızlandırılmış olur. Ayrıca, tripsin ve kimotripsin uygulaması sonucu APR seviyesinde artış şekillenmektedir. APR'ler, proteazlar (nötrofil elastaz ve cathepsinG) tarafından oluşturulan nekrotik hasarı inhibe ederler (Anonymus 2005).

Dokunun yangısal durumlarının azaltılmasında, fibrozisin minimize edilmesi esas teşkil eder ki bu durum ileri derecede yangı ve enfeksiyonların oluşmasını engeller (Kasseroller ve Wenning 2003).

İmmunomodülatör Etkileri

Proteolitik enzimler, enflamatuar cevabın başlıca regülatör ve modülatörleridir. Makrofaj ve doğal öldürücü hücrelerin etkilerini 7-10 kat arttırmak önemli eylemlerindendir (Anonymus 2010; Lenard 2010). Bununla birlikte, proteolitik enzimler tümör nekrozis faktör, interferon (IFN-g) ve interlökinler (IL-1,IL-6) gibi sitokinlerin üretimini indükler veya arttırlar (Weiner ve Piliro 1990).

Proteolitik enzimler, normal immun fonksiyonu inhibe edebilen patojenik immun kompleksleri indirgerler (Lenard 2010). İmmun kompleksler aşırı miktarda artınca, organizmanın ikinci savunma sistemi olan komplement sistemi uyarılmaktadır. Komplement sistemin uyarılmasıyla oto-immun bozukluklar ortaya çıkmaktadır. Tripsin, papain ve diğer proteolitik enzimler mevcut patojenik immun kompleksleri parçalayabilmekte hatta, oluşumlarını ilk yerlerinde önleyerek (oto-antikörlerin oluşumunun engellenmesine yardımcı olarak) lenfatik

drenajlarını arttırmaktadırlar (Solorazano del Rio 1994; Lenard 2010).

Oto-immun hastalıkların oluşmasına neden olan oto-immun tepkiler, hücreler haberleşmeyi sağlayan sitokinlerin aşırı derecede artmasıyla oluşmaktadır. Akut enfeksiyonlarda, ihtiyaç fazlası sitokin miktarı geçici olarak şekillenmekte, kroniklerde ise süreklilik arz etmektedir (Desser 2007d). Sitokin miktarı dengesinin bozulması oto-immun bozuklukların yanı sıra immun sistem supresyonu ile de sonuçlanmaktadır (Collins 2008). Proteolitik enzimler, bir plazma glikoproteini olan α -2-makroglobulin (α 2M)'e bağlanarak α -2-makroglobulin+proteaz kompleksini oluştururlar (Desser 2007d; Collins 2008). α -2-makroglobulin, organizmayı enzimlerin fazlalığından korumaya yarayan bir anti-proteazdır. İhtiyaç fazlası enzimlere bağlanarak, metabolize edilip ortadan kaldırılmalarını sağlar (Desser 2007d). α -2-makroglobulin+proteaz kompleksi diğer glikoproteine ve proteinlere bağlandığı gibi sitokinlere de bağlanmasıyla α -2-makroglobulin+proteaz+sitokin kompleksi oluşur ve ihtiyaç fazlası sitokinler makrofajlar tarafından hızlı bir şekilde elimine edilirler (Desser 2007d; Collins 2008). α -2-makroglobulinin proteaz aktivasyonu, oksidatif stres ve yüksek ateş sonucu hasara uğramış proteinlerin eliminasyonunu da kolaylaştırmaktadır. Ayrıca, α -2-makroglobulin+proteaz kompleksi immun yanıtı modifiye etmekte ve makrofajların hareket ve kemotaksisini desteklemektedir (Collins 2008).

Proteolitik enzim tedavisi, T-hücre bağımlı hastalıkların tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir (Lehmann 1996; Anonymus 2008).

Reproduksiyon alanında, hayvansal ve bitkisel proteolitik enzim kombinasyonu tedavileri, immunolojik etkenli abortuslarda (Dittmar 2000; Nouza ve Madar 2001) ve erkek-dişi kısırlıklarında (Nouza ve Madar 2001), immunomodülasyon etkileri bakımından faydalı bulunmuştur.

Antibiyotik Etkinliğini Destekleyici Etkileri

Yapılan çalışmalar, proteolitik enzimlerin kendi aralarında kombine edildiğinde sinerjizma oluşturmasının yanı sıra; antibiyotikler, sulfonamidler, steroidler ve diğer ilaçlarla da kombine edildiklerinde aynı şekilde sinerjik etki gösterdiklerini kanıtlamıştır (Solorazano del Rio 1994). Proteolitik enzimler, antibiyotik tedavisiyle birlikte kullanıldıklarında, antibiyoterapinin etkinliğini destekleyici bir faktör olarak görülmüştür (Rusca ve Perone 1969; Sibilla 1970; Melis 1990; Dittmar ve Weissenbacher 1992; Dittmar ve ark. 1993; Sukhikh ve ark. 1997; Friedrich 2003).

Proteolitik enzimlerle birlikte uygulanan antimikrobiyal tedavi, bakteriyel kontaminasyon ve antibiyotik rezistansında azalma sağlamaktadır (Daniushchenkova ve ark. 1982). Stafilocok enfeksiyonlarında, proteolitik enzimlerin antibiyotik etkinliğini arttırabilirdiği belirlenmiştir (Mecikoglu ve ark. 2006).

Proteolitik Enzimlerin Yan Etkileri ve Güvenilirlikleri

Uzun süre boyunca kullanılan enzim takviyelerinin güvenliğinin detaylı olarak araştırılması sonucu, yüksek oranda güvenli oldukları ve toksik limitlerinin olmadığı görülmüştür. Sağlıklı dokular ve hücreler doğaları gereği enzimatik saldırıdan etkilenmemektedirler. Organizmada birçok enzim inhibitörü mevcuttur. Proteolitik enzimler sadece ölü veya enfekte dokuların olduğu yerlerde tedavi fonksiyonu gösteren selektif yapılardır. Yapılan araştırmalarda toksik doz belirlenemediğinden, enzimlerle alakalı LD₅₀ de bulunamamıştır. İnsan dozu uygulanan

ratlarda herhangi bir rahatsızlık görülmemiştir (Anonymus 2010). Proteolitik enzimlerin gebelikte kullanımı güvenli olup, şimdiye kadar herhangi bir teratojenik etkileri bildirilmemiştir (Bowler 2010).

İNEKLERDE MASTİTİS TEDAVİSİNDE PROTEOLİTİK ENZİM KULLANIMI

Sığırlarda mastitislerin tedavisinde proteolitik enzimlerin kullanılmasıyla ilgili yeterli sayıda bilimsel çalışma olmamasına rağmen, yapılan araştırmalarda elde edilen olumlu sonuçlar, mastitis tedavisinin etkinliğinin arttırılması açısından umut verici niteliktedir.

Proteolitik enzimler, mastitis sırasında meme içinde şekillenen protein yapısındaki döküntülerin, kan pıhtısı ve fibrinlerin yıkılıp inceltmesi amacıyla kullanılabilir. Böylece antibiyotiklerin meme içi etkinliği artmaktadır. Meme dokusuna zarar vermeyen proteolitik enzimlerden tripsin, streptodornaz ve streptokinaz meme içi olarak, hyaluronidaz meme dışına pomat şeklinde kullanılmaktadır (Alaçam 1991; Devci ve ark. 1994).

Bake ve Illek (2006) 'in yaptıkları araştırmada; proteolitik enzimler antibiyotiklerle kombine şekilde lokal uygulandıklarında, antibiyotik dozunun azaltılmasına imkan tanımakta, tek başına yüksek dozda antibiyotik kullanımıyla aynı etkiyi sağlamakta ve enflamasyon şiddetinde belirgin bir azalma meydana getirmektedir.

Zander (1997) yaptığı çalışmada sadece proteolitik enzimler içeren meme tüpünü uygulamış, subklinik, akut ve kronik enfeksiyon gruplarında somatik hücre sayılarının uygulama sonrası dikkate değer düzeyde düştüğünü ve yüksek iyileşme oranlarının şekillendiğini tespit etmiştir.

Prosandeev (1990) mastitisli 166 inek üzerinde yapmış olduğu çalışmada, enzim ve antibiyotigi enjektabl formda kombine olarak kullanmıştır. Enjektabl tripsin uygulaması, enflamasyon sürecinin ilk fazında tedavinin etkinliğini arttırmıştır.

Dunkel (1967) kronik streptokok ve stafilocok mastitisli 320 meme lobuna, sulfadimidin+framisetin+streptomisin (SFS) kombinasyonu ve penisilin antibiyotik tedavisine, enzim karışımı ekleyerek ve enzimsiz olarak uygulayarak karşılaştırma yapmıştır. Enzim karışımı eklenen SFS ve penisilin gruplarında terapötik etkinin arttığı gözlenmiştir.

Muhammad ve arkadaşları (2000), fibröz mastitisli buffalolar ve ineklerin tedavisinde Tenazyme® ticari isimli antibiyotik+proteolitik enzim kombine meme tüpünü intramammar uygulamışlardır. Tedavi sonrası örneklerde bakteriyel üreme olmamış, fibrozis kaybolmuş ve süt veriminin yeniden normale dönmesiyle karakterize iyileşme şekillenmiştir.

Yapılan *in vitro* mikrobiyolojik çalışmalarda; tripsin, kimotripsin ve papainin, *Staphylococcus* spp. (Krüger ve ark. 1999), *Streptococcus* spp. (Krüger ve ark. 1999), *E.coli* (Krüger ve ark. 1999; Herzog 2005) ve *Salmonella* (Herzog 2005) bakterilerinin üremelerini inhibe ettikleri ve bu mikroorganizmaları öldürdükleri belirlenmiştir (Krüger ve ark. 1999; Herzog 2005).

Taşal ve arkadaşları (2008) yaptıkları çalışmada, saha şartlarında, laktasyondaki akut mastitisli ineklere meme içi uygulanan sefapirin+tripsin+kimotripsin kombinasyonunun (Sefapir®) tedavideki klinik etkinliğini %98.5 olarak tespit etmişlerdir.

Proteolitik enzimlerin (tripsin, kimotripsin, papain) meme içine uygulanmasını takiben iki saat içinde mikrobiyal kolonilerde dağılma meydana gelmektedir. Özellikle iyi

adhezyon yeteneğine sahip bakteriler (örn: *Staph. aureus*) saldırıya uğrayarak, yapışma özellikleri enzimler tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Zaremba 2002).

Subklinik, akut ve kronik meme yangılarında, eş zamanlı antibiyotik ve proteolitik enzim uygulamalarının, tek başına antibiyotik uygulamasına göre daha yüksek oranda bakteriyolojik iyileşme sağladığı tespit edilmiştir. Normal mastitis tedavisinde dirençli patojen olarak bilinen *Pseudomonas aeruginosa* ve *Candida parapsilosis*, tekrarlanan enzim tedavisi yardımıyla iyileştirilebilmektedir. Bu nedenle, proteolitik enzimlerin daha önce dirençli etiyolojiye sahip mastitis vakalarında da faydalı olabileceği bildirilmiştir (Zaremba 2002).

Mastitiste hastalığa direnç sürecinde immunmodülasyon, konakçı immünesinin istenen seviyeye göre ayarlanmasını sağlamaktadır (Sordillo ve Streicher 2002). Mastitise neden olan geniş bakteri çeşitliliği ve patojenitesi düşünüldüğünde, proteolitik enzimler etkili immunomodulatorler olarak görülmektedirler. Parenteral ve lokal uygulanan proteolitik enzim preparatlarıyla, mastitiste immun sistemin aktivasyonu veya reaktivasyonunun sağlanmasının yanı sıra, proteolitik enzimler immunmodülasyon etkiler göstermektedirler. Proteolitik enzimler hücresel yapışma moleküllerini etkileyerek, çeşitli immun reaksiyonları düzenlerler. Makrofajların fagositik aktivitesinde artış gözlenmektedir. Ayrıca zararlı sitokin fazlalığını minimize etmektedirler (Zaremba 2002).

Mastitis tedavisinde, proteolitik enzimler imm veya parenteral uygulandıklarında, organizmada bulunan anti-proteazların varlığı nedeniyle, canlı dokulara zarar vermemektedirler (Zaremba 2002).

2010-2012 tarihleri arasında, akut mastitisli 79 ineğe ait, 120 meme lobunda yapılan araştırmada (Aytekin 2012), ineklerde akut mastitis tedavisinde meme içi kullanılan tripsin ve kimotripsin proteolitik enzimlerinin (pankreatik proteazlar) antibiyotiklerle kombine edilmesinin tedavi etkinliğini arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Sonuç olarak; proteolitik enzimlerin olumlu etkileriyle tedaviye destek amacıyla kullanılacak bir seçenek olduğu ve destek tedavisinin gittikçe belirginleşen önemi dikkate alındığında bu alanda daha detaylı araştırmaların yapılarak, tedaviye olumlu etkileri olan proteolitik enzimlerin sığır mastitislerinin tedavisindeki faydasının göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alaçam E (1991).** Sığır Hastalıkları (Meme Hastalıkları Bölümü), Tümvet Yayınları, İstanbul, Türkiye, 577-584.
- Anonymus (2005).** Chymoral Forte data-sheet, Elder Pharmaceuticals Ltd, Mumbai, India. www.elderindia.com Erişim tarihi: 22 Ekim 2014.
- Anonymus (2008).** Why we need systemic enzymes. WAM Essentials, Inc. http://www.zymessence.com/why_systemic_enzymes.html Erişim tarihi: 1 Eylül 2013.
- Anonymus (2010).** Applications - Enzyme therapy. Advanced Enzymes Technologies Ltd, India. <http://www.enzymeindia.com/Applications-EnzymeTherapy.php> Erişim tarihi: 25 Kasım 2014.
- Anyulis E (1989).** Proteolytic enzymes in treatment of endometritis in cows. LVA Mokslo Darbai, Veterinariya/Proceedings of the Lithuanian Academy of Veterinary Medicine, *Vet Med*, 19, 117-122.
- Anyulis E (1991).** Antimicrobial preparations and proteolytic enzymes in treatment of endometritis in cows. LVA Mokslo Darbai, Veterinariya/Proceedings of the Lithuanian Academy of Veterinary Medicine, *Vet Med*, 20, 3-7.
- Aytekin Ö (2012).** Laktasyondaki akut mastitisli süt ineklerinde meme içi uygulanan 1. kuşak sefalosporin ve proteolitik enzim kombinasyonunun tedavideki etkinliği. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Van, Türkiye.

- Bake J, Illek J (2006).** Plasma ceruloplasmin and fibrinogen during enzyme therapy of mastitis in dairy cows. *Acta Vet Brno*, 75, 241-246.
- Biziulevichius GA, Lukauskas K (1998).** In vivo studies on lysosubtilin. 2. Efficacy for treatment of post-partum endometritis in cows. *Vet Res*, 29(1), 47-58.
- Bowler J (2010).** Precious enzymes. Precious Organics, Australia. http://www.preciousorganics.com.au/index_files/Page1024.htm Erişim tarihi: 30 Aralık 2013.
- Collins JJ (2008).** Systemic enzyme support. Poster presentation. <http://www.systemicenzymesupport.org/poster/ses.pdf> Erişim tarihi: 11 Ağustos 2014.
- Contreras A, Paape MJ, Miller RH, Corrales JC, Luengo C, Sánchez A (2009).** Effect of bromelain on milk yield, milk composition and mammary health in dairy goats. *Trop Anim Health Prod*. 41(4), 493-498.
- Daniushchenkova NM, Berenshtein TF, Kardovich GA, But-Gusdaim AM (1982).** Efficacy of antibiotics and proteolytic enzymes in the treatment of patients with chronic osteomyelitis. *Antibiotiki*, 27(3), 196-199.
- Dessarzin D, Meylan D, Volet B (1961).** Treatment of abscessing mastitis by puncture and drainage by means of a polyethylene sound with general and local antibiotic therapy associated with proteolytic enzymes. Analysis of current therapeutic trends. *Ther Umsch*, July; 18, 259-266.
- Desser L (2007a).** Description of some enzymes used in therapy. http://www.enzymetherapy.at/cms/?page_id=8 Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Desser L (2007b).** Diseases in which enzyme therapy is beneficial. <http://www.enzymetherapy.at/cms/?cat=32&lang=en> Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Desser L (2007c).** History of enzyme therapy. http://www.enzymetherapy.at/cms/?page_id=9 Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Desser L (2007d).** How does enzyme therapy work? http://www.enzymetherapy.at/cms/?page_id=7 Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Desser L (2007e).** What are enzymes? http://www.enzymetherapy.at/cms/?page_id=4?&lang=en Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Desser L (2007f).** Why enzyme therapy? <http://www.enzymetherapy.at/cms/?&lang=en> Erişim tarihi: 11 Aralık 2014.
- Deveci H, Apaydın AM, Kalkan C, Öcal H (1994).** Evcil Hayvanlarda Meme Hastalıkları. Fırat Üniversitesi Basımevi, Elazığ, Türkiye.
- Dittmar FW (2000).** Enzyme therapy - A method of immune therapy for immunologically caused habitual abortions. *Forum Immunologie*, No. 3/2000, II - VIII.
- Dittmar FW, Weissenbacher ER (1992).** Therapy of adnexitis - Enhancement of the basic antibiotic therapy with hydrolytic enzymes. *Int J Exp Clin Chemother*, 5, 2, 73-81.
- Dittmar FW, Weissenbacher ER, Vogel S (1993).** Hydrolytic enzymes as support for the basic therapy with antibiotics in the treatment of adnexitis. *Arch Gynecol Obstet*, 254 (1-4), 631-633.
- Drillich M, Raab D, Wittke M, Heuwieser W (2005).** Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes. A field trial. *Theriogenology*, 63(7), 1811-1823.
- Dunkel R (1967).** Treatment of bovine mastitis with antibiotics and sulphonamides together with proteolytic enzymes and vitamin A. Proceedings. 4th Int. Meet. Wld Ass. Buiatrics, Zurich 1966, 520-525.
- Ermiglia G (1959).** The effectiveness of enzyme therapy (Trypsin and Chymotrypsin) in mastitis (acute and chronic). *Riv Ostet Ginecol Prat*, 41, 890-892.
- Friedrich F (2003).** Wobenzym® in the treatment of chronic pelvic inflammatory disease. Pharmascrypt Report, Kathi-Kobus-Steig 1, W-8190. Study Number: MU-89210, Germany.
- Gostishchev VK, Tambiev EI (1978).** Proteolytic enzymes in complex treatment of mastitis. *Sov Med*, 5, 80-83.
- Grigorian AV, Gostishchev VK, Kostikov BA, Shkliarov SK (1974).** Proteolytic enzymes in the treatment and prevention of suppurative mastitis. *Vestn Khir Im I Grek*, 112(1), 23-27.
- Herzog P (2005).** Effects of the enzyme combination Trypsin / Chymotrypsin / Papain on enterohaemolytic *E. coli* and *Salmonella* strains. [Wirkung der Enzymkombination Trypsin-Chymotrypsin-Papain auf enterohämolyisierende *E. coli* und *Salmonellen*]. Dissertation PhD. Institut of Bakteriologie und Mykologie at Veterinärmedizinischer Fakultät der Universität Leipzig, Germany.
- Kasseroller R, Wenning HG (2003).** Efficacy and tolerability of proteolytic enzymes as an anti-inflammatory agent in lymphoedema after axillary dissection due to mammary cancer. *European J Lymp*, 10 (37-38), 18-26.
- Khanin AG, Tambiev EI (1979).** Wound infection of the breast and enzyme therapy. *Klin Med (Mosk)*, 57(5), 56-61.
- Krüger M, ThiHien T, Zaremba W, Penka L (1999).** Untersuchungen zum einfluss der proteolytischen enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Papain auf euterpathogene mikroorganismen. *Tierärztl Prax*, 27, 207-215.

- Lehmann PV (1996)**. Immunomodulation by proteolytic enzymes. *Nephrol Dial Transplant*, 11, Editorial Comments, 953-955.
- Lenard L (2010)**. Systemic multi-enzyme therapy. Unizyme: Enzyme research breakthrough - part I. <http://www.vrp.com/physical-performance/unizyme-enzyme-research-breakthrough-part-i-systemic-multi-enzyme-therapy> Erişim tarihi: 10 Ekim 2013.
- Leppanen MK (1961)**. Treatment of suppurative mastitis by aspiration and with Streptokinase-Streptodornase and antibiotics. *Ann Chir Gynaecol Fenn*, 50, 272-278.
- Marushka R (1989)**. Treatment of cow uterus with enzyme and antimicrobial preparations, LVA Mokslo Darbai, Veterinariya/Proceedings of the Lithuanian Academy of Veterinary Medicine, *Vet Med*. 19, 153.
- Mecikoglu M, Saygi B, Yildirim Y, Karadag-Saygi E, Ramadan SS, Esemeli T (2006)**. The effect of proteolytic enzyme Serratiopeptidase in the treatment of experimental implant-related infection. *J Bone Joint Surgery (American)*, 88, 1208-1214.
- Melis GB (1990)**. Clinical experience with Methoxybutopate vs. Bromelain in the treatment of female pelvic inflammation. *Minerva Ginecol*, 42 (7-8), 309-312.
- Muhammad G, Saqib M, Athar M (2000)**. Evaluation of Tenazyme™ for the treatment of mastitis in buffaloes and a cow. *Pakistan Vet J*, 20 (4), 212.
- Nouza K, Madar J (2001)**. Immunomodulation in the treatment of reproduction disturbances. *Am J Repro Immun*, 46 (1), 106.
- Percival M (1999)**. Understanding the natural management of pain and inflammation. Advanced Nutrition Publications Inc, *Clin Nutrition Insights*, NUT030 Rev. 4/99.
- Prosandeev V (1990)**. Mastitis: Current problems and methods of treatment. *Sel'skoe Khozyaistvo Uzbekistana*, 2, 17-18.
- Raker CW (1957)**. Use of enzymes in veterinary medicine. *Ann NY Acad Sci*, 68(1), 144-150.
- Rusca F, Perone N (1969)**. Combination of tetracycline and pancreatic proteolytic enzymes in the therapy of gynecologic inflammation [Associations de la tetracycline et d'enzymes proteolytiques pancreatiques dans la therapie des phlogoses gynecologiques]. *Praxis*, 58 (17), 556-559.
- Scheindlin S (2007)**. Clinical enzymology: Enzymes as medicine. *Mol Interv*, 7, 4-8.
- Shelyugina ZG, Avdeenko VS, Gonchar AM, Salganik RI, Pankov BG, Goncharov VP, Stradina Yu N (1989)**. Immobilized proteolytic enzymes for post-partum purulent-catarrhal endometritis in cows, *Veterinariya (Moscow)*, 6, 41-42.
- Sibilla P (1970)**. Proteolytic enzymes with a factor favouring the efficacy of antibiotic therapy in osteomyelitis. *Arch Ortop*, 83(1), 85-90.
- Solorazano del Rio HE (1994)**. Systemic enzyme therapy-supplement to the art of getting well. Programa de Estudios de Medicinas Alternativas, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, Jal. Mexico.
- Storozhuk VT, Babich MM (1986)**. Use of papain and ultrasound in the combined treatment of gangrenous lactation mastitis. *Klin Khir*, (1), 47-48.
- Storozhuk VT, Shamolina II, Lobova AB (1985)**. Immobilized papain in the treatment of acute destructive lactation mastitis. *Vestn Khir Im I Grek*, 135(10), 42-46.
- Storozhuk VT, Sutiuseva RR, Aikenova ZZ (1984)**. Treatment of acute lactational mastitis with proteolytic enzymes of plant origin. *Klin Khir*, (1), 73-74.
- Sukhikh GT, Loginova NS, Faizullin LZ, Zdanov AV, Malinina EV, Bozedomov VA (1997)**. The use of WOBENZYM® to facilitate interferon synthesis in the treatment of chronic urogenital Chlamydia. *Int J Immunotherapy*, 8 (3-4), 131-133.
- Tambiev EI (1977)**. Enzymatic therapy in the overall treatment of the initial forms of mastitis. *Vopr Okhr Materin Det*, 22 (12), 66-67.
- Taşal İ, Aytekin Ö, Kurucaoglu A (2008)**. Laktasyondaki akut mastitisi ineklerde Sefapirin-Tripsin-Kimotripsin kombinasyonu (Sefapir) meme içi tedavinin etkinliği. Poster Sunum. 3. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi (Uluslararası katılımlı), 23-26 Ekim, Antalya, Türkiye.
- Viswanatha Swamy A, Patil PA (2008)**. Effect of some clinically used proteolytic enzymes on inflammation in rats. *Indian J Pharm Sci*, 70, 114-117.
- Weiner M, Piliero SJ (1990)**. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. *Ann Rev Pharmacol* 10, 171-198.
- Zander H (1997)**. Klinische untersuchungen über die wirksamkeit von enzymen bzw. Enzym-/antibiotika kombinationen bei der therapie von mastitiden unterschiedlicher genese und manifestation [Examinations about the effectiveness of enzymes and enzyme/antibiotic-combinations in the therapy of different kind of bovine mastitis]. Dissertation, Berlin: Free University of Berlin, Faculty of Veterinary Medicine, Germany.
- Zarembo W (2002)**. The mode of effect of proteolytic enzymes applied therapeutically in animals. Veyx-Pharma GmbH Publication, Germany.





The Relationship Between Adiponectin and Some Kinds of Cancer

Nizamettin GÜNBATAR Bahattin BULDUK

Yuzuncu Yil University, School of Health Science, Van, Turkey

Received: 15.05.2015

Accepted: 26.06.2016

SUMMARY

Adiponectin is one of the adipocytokines secreted by the fat cells of the adipose tissue and on which mostly there has been studies on. This adipocytokine has important functions such as antidiabetic, antiatherosclerotic, antiinflammatory and inhibitory effects in the formation and developments of malignancies related with obesity. The metabolic effects of adiponectin are mediated by the adiponectin receptors, AdipoR1 and AdipoR2. In this review, overall structure and characteristics of adiponectin and the relation of its blood levels with some types of cancer has been discussed.

Key Words: Adiponectin, Cancer, Adipose Tissue, Antidiabetic, Receptor

ÖZET

Adiponektinin Bazı Kanser Türleri ile İlişkisi

Adiponektin adipoz dokuda yağ hücreleri tarafından salınan ve son zamanlarda üzerinde en çok çalışma yapılan adipositokinlerden birisidir. Bu adipositokin antidiyabetik, antiaterosklerotik, antiinflamatuvar ve obezite ilişkili malignansilerin oluşumu ve gelişimini önlemede önemli fonksiyonlara sahiptir. Adiponektinin metabolik etkilerine Adiponektin reseptörleri AdipoR1 ve AdipoR2 aracılık etmektedir. Bu derlemede adiponektinin genel yapısı, özellikleri ve dolaşımdaki miktarının kanser ile olan ilişkisi değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Adiponektin, Kanser, Adipoz doku, Antidiyabetik, Reseptör

GİRİŞ

Yağ dokusundan sentezlenen antiaterojenik ve antiinflamatuvar bir adipokin olan adiponektin ilk olarak, fare adiposit hücre dizisinden salgılanan 3T3-L1 isimli bir poretin olarak tanımlandı. İnsan adiponektini bundan 1 yıl sonra bulundu ve apM1 olarak isimlendirildi (Scherer ve ark., 1995; Maeda ve ark., 1996). Adiponektin, jelatin bağlayıcı protein-28, (GBP2) (Nakano ve ark., 1996) Acrp30, AdipoQ ve apM1 olarak da bilinmektedir ve yapısal olarak kompleman 1q'a(C1q) benzemektedir (Shapiro ve Scherer 1998). Antiinflamatuvar özelliğine sahip adiponektinin dolaşımdaki düşük düzeydeki miktarı inflamasyon, (Günbatar 2014) metabolik sendrom ve kolorektal kanser başta olmak üzere tüm kanser türleriyle yakından ilişkilidir (Barb ve ark 2007). Adiponektinin konsantrasyonları ile kanser hücrelerinin proliferasyonunu önlemesi arasındaki ilişki bu hormonun anti kanser rolünü göstermektedir (Mantzoros ve ark., 2004; Tian ve ark., 2007).

Adiponektinin genel yapısı ve özellikleri

Adiponektin 248 amino asit içeren, 30 kDa büyüklüğünde ve dolaşımda en yüksek düzeyde bulunan bir adipokin olup (Steffes ve ark., 2004) metabolik sendrom ve tip 2 diyabetin gelişmesi ile ilişkili olan 3q27 kromozom üzerinde lokalizedir (Kisebah ve ark., 2000; Takahashi ve

ark., 2000). Plazma adiponektin seviyesi sağlıklı bireyde 10µg/mL olup toplam plazma proteinlerinin 0.01%'ini oluşturur (Barb ve ark., 2007a). Erkeklerde testosteron hormonu, adipoz dokuda yüksek moleküler ağırlıklı (HMW) adiponektin üretimini engelleyerek, serum adiponektin konsantrasyonunun azalmasına neden olur (Xu ve ark., 2005). Adiponektinin yakın bir zamanda tanımlanmış AdipoR1 ve AdipoR2 olmak üzere iki reseptörü bulunmaktadır (Beltowski 2003; Yamauchi ve ark., 2003) ve her iki reseptörde homo ve hetero-multimer özelliğine sahiptir (Kadowaki ve Yamauchi 2005). AdipoR1 çoğunlukla kasta, AdipoR2 ise karaciğerde ekspres edilir (Yamauchi ve ark., 2003). Her iki reseptör pankreatik β ve kanser hücresi dahil olmak üzere her dokuda farklı oranda bulunur (Kharroubi ve ark., 2003; Chinetti ve ark., 2004).

Adiponektinin düşük moleküler ağırlıklı (LMW) trimer, orta-moleküler ağırlıklı (MMW) heksamer ve yüksek-moleküler ağırlıklı (HMW) 12-18-mer adiponektin olmak üzere üç büyük oligomerik formu bulunmaktadır (Pajvani ve ark., 2003; Waki ve ark., 2003). HMW proinflamasyondan sorumlu iken, LMW anti inflamasyondan sorumludur (Tilg ve Moschen 2006). HMW'nin metabolik sendrom, insülin direnci ve kardiyovasküler hastalıklarda biyolojik aktivite olarak güçlü bir ilişkisi vardır (Blüher ve ark., 2007; Heidemann ve ark., 2008).

HMW adiponektin, yüklemeye yapılmış glikoz konsantrasyonunda, total adiponektine göre daha yakın ilişkilidir (Fisher ve ark., 2005). Adiponektin karaciğer (Trujillo ve Scherer 2005), entotel hücre (Ouchi ve ark., 2004) ve iskelet kasındaki etkisinin çoğunu HMW aracılığıyla göstermektedir (Hada ve ark., 2007). Deoksiribonükleik asit (DNA) dizi analizi çalışmaları ile adiponektinin bir salgı proteini olduğu, sinyal peptidi içerdiği, N terminalinde, bir non-kollajen dizinin ve bunu G-X-Y tekrarlarından oluşan kısa bir kollajen benzeri motifin takip ettiği, C terminalinin ise kollajen X, kollajen VIII ve kompleman proteini C1q ile önemli oranda homolog olduğu bildirilmektedir (Scherer ve ark., 1995; Fruebis ve ark., 2001).

Adiponektin ve kanser

Adiponektin konsantrasyonu ile obezite, metabolik sendrom, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır (Grossmann ve ark., 2008; Otvos Jr ve ark., 2011). Hipoadiponektemi obezite ile ilişkili tümörler, insülin direnci, (Kelesidis ve ark., 2006) endometrial, (Petridou ve ark., 2003; Dal Maso ve ark., 2004) kolon, (Wei ve ark., 2005) böbrek, (Spyridopoulos ve ark., 2007) postmenapozal meme (Dalamaga ve ark., 2011) ve lösemi (Petridou ve ark., 2006) gibi kanser türleriyle yakından ilişkilidir. Adiponektin, kanser için önemli risk faktörlerinden olan obezite ve insülin direnci üzerindeki etkisinden dolayı meme kanserlerinde antikanser ajan özellik göstermektedir (Kelesidis ve ark., 2006). Adiponektinin, dolaşımdaki yüksek miktarları ile kanser gelişimi arasında pozitif ilişkileri olan, östrojen ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF1)'in salgılanma düzeylerini azaltıcı yönde önemli bir rolü vardır (Kaklamani ve ark., 2008).

Adiponektin ve gastrointestinal sistem kanserleri

Adiponektin seviyesinin sağlıklı bireylere göre, özellikle üst mide kanseri olan bireylerde daha düşük düzeyde olduğu bildirilmektedir (Ishikawa ve ark., 2005). Kolon ve kolorektal kanserler ile serum adiponektin seviyesi arasında negatif bir ilişki bulunmaktadır (Lukanova ve ark., 2006; Otake ve ark., 2010). Kolorektal kanserin erken evresinde düşük adiponektin seviyesi, kanserin oluşumu açısından beden kitle indeksi ve trigliseritten daha önemlidir (Otake ve ark., 2010). Özefagus kanserli hastalarda adiponektin seviyesinin önemli ölçüde ($P<0.001$) düşük olduğu bildirilir (Yıldırım ve ark., 2009).

Dolaşımdaki adiponektin seviyesi kolorektal kanserli ve adenomalı hastalarda sağlıklı bireylere göre, düşük düzeyde bulunmaktadır (Xu ve ark., 2011; An ve ark., 2012). Kolorektal kanser riski ile düşük plazma adiponektin seviyesi arasında negatif bir ilişki vardır (Wei ve ark., 2005). Yüksek adiponektin konsantrasyonuna sahip bireylerde, kolorektal kansere yakalanma riskinin %60 azaldığı bildirilmektedir (Kumar ve ark., 2009; Catalan ve ark., 2011). Düşük adiponektin konsantrasyonunda görülen, dolaşımdaki insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein (IGFBP) düzeylerinin azalması, serbest IGF miktarını artırarak, kolorektal kanser hücrelerinde apoptozisin engellenmesine ve kanser hücrelerinin çoğalmasına neden olur (Wei ve ark., 2005).

Adiponektin ve meme kanseri

Yetişkinlerde kilo alımı ve aşırı şişmanlık ile meme kanseri arasında, postmenapozal dönemde pozitif, premenapozal dönemde ise negatif bir ilişki bulunmaktadır (Renehan ve ark., 2008). Düşük, total ya da yüksek moleküler ağırlıklı

(HMW) adiponektin seviyesi, klasik risk faktörlerinden olan leptin ve IGF'den bağımsız olarak postmenapozal meme kanseri riskini artırır (Dalamaga ve ark., 2011). Adiponektin, düşük östrojen seviyesi görülen postmenapozal dönemindeki bayanlarda meme kanseri etyopatogenezisinde önemli rol oynar (Körner ve ark., 2007). Adiponektin reseptör 1 ve 2 AdipoR1/R2 meme kanseri hücre hattı ve doku örneklerinde ekspresse edilmektedir ve adiponektin, reseptörleri aracılığıyla sadece hormonal dengesizliği düzenlemeyip, aynı zamanda meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını da engelleme özelliğine sahiptir (Körner ve ark., 2007). İnsülin ve adipoz doku hormonları ile östrojen ve progesteron sinyal yolları arasındaki karşılıklı ilişki, adiponektinin sekresyon ve etkisinden sorumludur (Lorincz ve Sukumar 2006; Vona-Davis ve Rose 2007). Obezite ve insülin direncine bakılmaksızın östrojen ve progesteron reseptörü negatif olan meme kanserlerinde, kanserin tekrarlanması ile serum adiponektin seviyeleri arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır (Oh ve ark., 2011).

Adiponektin ve endometrial kanser

Yüksek beden kitle indeksi (BMI) ve adipozite özellikle premenapozal bayanlarda göğüs kanseri gelişme riskini azaltırken, endometrial kanser gelişme riskini arttırmaktadır (Renehan ve ark., 2008). Leptin, BMI ve IGF sisteminden bağımsız olarak, 65 yaşından genç bayanlarda düşük adiponektin seviyesi ile endometrial kanser gelişme riski arasında negatif ilişki bulunmaktadır (Petridou ve ark., 2003). Adiponektinin endometrial kanser hücrelerinin çoğalmasını önleme etkisi, AdipoR'ler tarafından, adenosin mono fosfat kinaz (AMPK)'ın aktivasyonuna aracılık eden, adiponektinden sorumlu adaptör molekül, karaciğer kinaz B1 (LKB1) düzeyinin artırılmasıyla olur (Moon ve ark., 2011). Adiponektin insülin duyarlılığını ve serbest yağ asidi oksidasyonunu artırıcı etkisi olan AMPK düzeyini yükseltir (Barb ve ark., 2007). AMPK kanser hücrelerinin çoğalması, apoptozis ve insülin direnci üzerindeki direkt etkisi ile tümör büyümesini engellemektedir (Cust ve ark., 2007). AdipoR'lerin genellikle AMPK yolları aracılığıyla etkilerini göstermesi, adiponektinin kanser hücrelerinin çoğalması üzerindeki engelleyici etkisinin, AMPK'nın aktiviteleri aracılığıyla olması, düşük AMPK düzeyinin endometrial kanserlerin gelişiminde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermektedir (Jeong ve ark., 2011).

AdipoR1 ve R2 menstrual siklusun orta fazında endometriumda yüksek düzeyde ekspresedirler (Tokemura ve ark., 2006). Nonneoplastik dokuda AdipoR'ler eşit miktarda ifade edilirken, insan endometrial kanser dokusunda AdipoR1, AdipoR2'den daha yüksek miktarda bulunmaktadır (Moon ve ark., 2011). Obezite ve düşük adiponektin birlikteliği endometrial kanser oluşumu için büyük bir risk faktörüdür (Petridou ve ark., 2003; Miyoshi ve ark., 2003). Düşük prediagnostik plazma adiponektin seviyesi, özellikle obez ve pre/postmenapozal bayanlarda BMI, C-peptid seviyeleri, seks steroid hormonları, IGF bağlayıcı protein 1(IGFBP1) ve IGFBP2'den bağımsız olarak endometrial kanser görülme riskinin, artmasına neden olur (Cust ve ark., 2007).

Adiponektin ve prostat kanseri

Düşük adiponektin seviyesi, sadece prostat kanseri gelişimi ile değil (Michalakakis ve ark., 2007; Arisan ve ark., 2009), aynı zamanda hastalığın histolojik derecesi ve evresi ile de yakından ilişkilidir (Li ve ark., 2010). Yüksek adiponektin seviyesine sahip erkeklerde prostat kanser görülme riski BMI, yaş ve diğer klasik faktörlerden

bağımsız olarak %70 oranında azalmaktadır (Michalakos ve ark., 2007). Prostat kanserin patogenezinde adiponektinin etkinliğini destekleyen adiponektin reseptörlerinin ifadesi, malign prostat dokularında, benign prostat dokularına göre daha düşük düzeydedir (Baillargeon ve ark., 2006). Dolaşımdaki yüksek adiponektin konsantrasyonu, yüksek dereceli veya metastatik kanser gelişme riskini düşürmektedir (Li ve ark., 2010). Obezitenin, insülin üretimini ve direncini arttırarak, prostat kanser riskinin artmasıyla sonuçlanan, AMPK'nın aktivitesini ve adiponektin seviyesini düşürdüğü bildirilmektedir. (Michalakos ve ark., 2007; Li ve ark., 2010). Adiponektin AMPK'nın aktivasyonunu %90 arttırarak prostat kanser hücrelerinin büyümesini azaltır (Xiang ve ark., 2004).

Sonuç olarak, adiponektin adipoz dokudan yağ hücreleri tarafından salınan ve organizmadaki etkilerini reseptörleri aracılığıyla gösteren önemli bir adipositokindir. Adiponektinin dolaşımdaki miktarı ile kanser oluşumu arasında negatif bir ilişki vardır. İlerde adiponektin ile ilgili adiponektinin dolaşımdaki miktarının yükseltilmesi ve reseptörlerinin etkinliğini arttıracak yöntemlerin belirlenmesine yönelik yapılacak olan moleküler düzeydeki çalışmalar, kanser ile mücadelede etkin yöntemlerin geliştirilmesine önemli katkı sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- An W, Bai Y, Deng SX, et al (2012). Adiponectin levels in patients with colorectal cancer and adenoma: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*, 21, 126-133.
- Arisan ED, Arisan S, Atis G, Palavan-Unsal N, Ergenekon E (2009). Serum adipocytokine levels in prostate cancer patients. *Urol Int*, 82,203-208.
- Baillargeon J, Platz EA, Rose DP, et al (2006). Obesity, adipokines, and prostate cancer in a prospective population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 1331-1335.
- Barb D, Neuwirth A, Mantzoros CS, and Balk PS (2007). Adiponectin signals in prostate cancer cells through Akt to activate the mammalian target of rapamycin pathway. *Endocrine-Related Cancer*,14, 995-1005.
- Barb D, Williams CJ, Neuwirth AK, Mantzoros CS (2007a). Adiponectin in relation to malignancies: a review of existing basic research and clinical evidence. *American J of Clin Nut*, 86, 858-866.
- Beltowski J (2003). Adiponectin and resistin—new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit*, 9, 55-61.
- Blüher M, Brennan AM, Kelesidis T, et al (2007). Total and high-molecular weight adiponectin in relation to metabolic variables at baseline and in response to an exercise treatment program: comparative evaluation of three assays. *Diabetes Care*, 30,280-285.
- Catalan V, Go mez-Ambrosi J, Rodriguez A, et al (2011). Up-regulation of the novel proinflammatory adipokines lipocalin-2, chitinase-3 like-1 and osteopontin as well as angiogenic-related factors in visceral adipose tissue of patients with colon cancer. *J Nutr Biochem*, 22, 634-641.
- Chinetti G, Zawadzki C, Fruchart JC, Staels B (2004). Expression of adiponectin receptors in human macrophages and regulation by agonists of the nuclearreceptors PPAR, PPAR, and LXR. *Biochem Biophys Res Commun*, 314, 151-158.
- Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C (2007). Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. *J of Clinic Endoc and Met*, 92, 255-263.
- Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, et al (2007). Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre- and postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 255-263.
- Dal Maso L, Augustin LS, Karalis A, et al (2004). Circulating adiponectin and endometrial cancer risk. *J Clin Endocrinol Metab*, 89, 1160-1163.
- Dalamaga M, Karmaniolas K, Papadavid E, Pelekanos N, Sotiropoulos G, Lekka A (2011). Elevated serum visfatin/nicotinamide phosphoribosyl-transferase levels are asso-ciated with risk of postmenopausal breast cancer indepen-dently from adiponectin, leptin, and anthropometric and metabolic parameters. *Menopause*, 18, 1198-1204.
- Fisher FM, Trujillo ME, Hanif W, et al (2005). Serum high molecular weight complex of adiponectin correlates better with glucose tolerance than total serum adiponectin in Indo-Asian males. *Diabetologia*, 48, 1084-1087.
- Fruebis J, Tsao TS, Javorschi S, et al (2001). Proteolytic cleavage product of 30-kDa adipocyte complement-related protein increases fatty acid oxidation in muscle and causes weight loss in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 2005-2010.
- Grossmann ME K, Nkhata J, Mizuno NK, Ray A, Cleary MP (2008). Effects of adiponectin on breast cancer cell grow thand signaling. *British Journal of Cancer*, 98, 370-379.
- Günbatar N, (2014). Ratlarda yüksek oranda doymuş yağlı diyet ile aralıklı beslemenin deneysel kolon kanseri gelişimi ve bazı serum inflamasyon markırları üzerine etkisi. YYÜ. Sağ Bil Enst Doktora Tezi, s:79, Van,
- Hada Y, Yamauchi T, Waki H, et al (2007). Selective purification and characterization of adiponectin multimer species from human plasma. *Biochem Biophys Res Commun*, 356, 487-493.
- Heidemann C, Sun Q, van Dam RM, et al (2008). Total and high molecular weight adiponectin and resistin in relation to the risk for type 2 diabetes in women. *Ann Intern Med*, 149, 307-316.
- Ishikawa M, Kitayama J, Kazama S, Hiramatsu T, HatanoK, Nagawa H (2005). Plasma adiponectin and gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 11, 466-472.
- Jeong JY, Bong JG, Park SH, Choi JH, Oh HK (2011). Expression of leptin, leptin receptor, adiponectin, and adiponectin receptor in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Journal of Breast Cancer*, 14, 96-103.
- Kadowaki T, Yamauchi T (2005). Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev*, 26, 439-451.
- Kaklamani VG, Sadim M, Hsi A (2008). Variants of the adiponectin and adiponectin receptor 1 genes and breast cancer risk. *Cancer Research*, 68, 3178-3184.
- Kelesidis I, Kelesidis T, Mantzoros CS (2006). Adiponectin And cancer: a systematic review. *Br J Cancer*, 94, 1221-1225.
- Kharroubi I, Rasschaert J, Eizirik DL, Cnop M (2003). Expression of adiponectin receptors in pancreatic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 1118-1122.
- Kissebah AH, Sonnenberg GE, Myklebust J, et al (2000). Quantitative traitloci on chromosomes 3 and 17 influence phenotypes of the metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 14478-14483.
- Körner A, Pazaitou-Panayiotou K, Kelesidis T, et al (2007). Total and high molecular weight adiponectin in breast cancer: invitroandin vivostudies. *J Clin Endocrinol Metab*, 92, 1041-1048.
- Kumar A, Daniel P, Pietruczuk M, Malecka-Panas E (2009). Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients. *Int J Colorectal Dis*, 24, 275-281.
- Li H, Stampfer MJ, Mucci L, et al (2010). A 25-year prospective study of plasma adiponectin and leptin concentrations and prostate cancer risk and survival. *Clin Chem*, 56, 34-43.
- Lorincz AM, Sukumar S (2006). Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13, 279-292.
- Lukanova A, Oderberg SS, Kaaks R, Jellum E, Stattin P (2006). Serum adiponectin is not associated with risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention*, 15, 401-402.
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, Funahashi T, Matsuzawa Y, Matsubara K (1996). cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 221, 286-28.
- Mantzoros C, Petridou E, Dessypris N (2004). Adiponectin and breast cancer risk. *J of Clinic Endoc and Met*, 89, 1102-1107.
- Michalakos K, Williams CJ, Mitsiades N, et al (2007). Serum adiponectin concentrations and tissue expression of adiponectin receptors are reduced in patients with prostate cancer: a case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 308-313.
- Moon HS, Chamberland JP, Aronis K, Tseleni-Balafouta S, Mantzoros CS (2011). Direct role of adiponectin and adiponectin receptors in endometrial cancer: in vitro and ex vivo studies in humans. *Mol Cancer Ther*, 10, 2234-2243.
- Miyoshi Y, Funahashi T, Kihara S, et al (2003). Association of serum adiponectin levels with breast cancer risk. *Clin Cancer Res*, 9, 5699-5704.
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura NH, Mazda T &Tomita (1996). Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. *Journal of Biochemistry*, 120, 803-812.
- Oh SW, Park CY, Lee ES, et al (2011). Adipokines, insulin resistance, metabolic syndrome, and breast cancer recurrence. acohortstudy. *Breast Cancer*, 13-34.
- Otake S, Takeda H, Fujishima S (2010). Decreased levels of plasma adiponectin associated with increased risk of colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 16, 1252-1257.
- OtvosJr L, Haspinger E, Russa FL (2011). Design and development of a peptide-based adiponectin receptor agonist for concert treatment, *BMC Biotechnology*, 11, 90-94.
- Ouchi N, Kobayashi H, Kihara S, et al (2004). Adiponectin stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*, 279, 1304-1309.
- Pajvani UB, Xueliang D, Combs TP (2003). Structure-function studies of the adipocyte secreted hormone Acrp30/ adiponectin. Implications for metabolic regulation and bioactivity. *J Biol Chem*, 278, 9073-9085.
- Petridou E, Mantzoros CS, Dessypris N, Dikalioti SK, Trichopoulos D (2006). Adiponectin in relation to childhood myeloblastic leukaemia. *Br J Cancer*, 94, 156-160.
- Petridou E, Mantzoros C, Dessypris N, et al (2003). Plasma adiponectin concentrations in relation to endome-trial cancer: a case-control study in Greece. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 993-997.

- Rehman AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M (2008).** Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*, 371, 569–578.
- Scherer PE, Williams S, Fogliano M, Baldini G, Lodish HF (1995).** A novel serum protein similar to Clq produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 270, 26746–26749.
- Shapiro L, Scherer PE (1998).** The crystal structure of a complement-1q family protein suggests an evolutionary link to tumor necrosis factor. *Curr Biol*, 8, 335–338.
- Spyridopoulos TN, Petridou ET, Skalkidou A, et al (2007).** Low adiponectin levels are associated with renal cell carcinoma: a case-control study. *Int J Cancer*, 120, 1573–1578.
- Steffes MW, Gross MD, Schreiner PJ, et al (2004).** Serum adiponectin in young adults: interactions with central adiposity, circulating levels of glucose, and insulin resistance: the CARDIA study. *Ann Epidemiol*, 14, 492–98.
- Takahashi M, Arita Y, Yamagata K, et al (2000).** Genomic structure and mutations in adipose-specific gene, adiponectin. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 24, 861–868.
- Takemura Y, Osuga Y, Yamauchi T, et al (2006).** Expression of adiponectin receptors and its possible implication in the human endometrium. *Endocrinology*, 147, 3203–3210.
- Tian YF, Chu CH, Wu MH (2007).** Anthropometric measures, plasma adiponectin, and breast cancer risk. *Endocrine Related Cancer*, 14, 669–677.
- Tilg H, Moschen AR (2006).** Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, 772–783.
- Trujillo ME, Scherer PE (2005).** Adiponectin: journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *J Intern Med*, 257, 167–175.
- Vona-Davis L, Rose DP (2007).** Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer*, 14, 189–206.
- Waki H, Yamauchi T, Kamon J, (2003).** Impaired multimerization of human adiponectin mutants associated with diabetes: molecular structure and multimer formation of adiponectin. *J Biol Chem*, 278, 40352–40363.
- Wei EK, Giovannucci E, Fuchs CS, Willett WC, Mantzoros CS (2005).** Low plasma adiponectin levels and risk of colorectal cancer in men: a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 97, 1688–1694.
- Wolk A, Gridley G, Svensson M, et al (2001).** A prospective study of obesity and cancer risk (Sweden). *Cancer Causes Control*, 12, 13–21.
- Xiang X, Saha AK, Wen R, Ruderman NB, Luo Z (2004).** AMP-activated protein kinase activators can inhibit the growth of prostate cancer cells by multiple mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 321, 161–167.
- Xu A, Chan KW, Hoo RLC (2005).** Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J of Bio Chem*, 280, 18073–18080.
- Xu XT, Xu Q, Tong JL, et al (2011).** Meta-analysis: circulating adiponectin levels and risk of colorectal cancer and adenoma. *J Dig Dis*, 12, 234–244.
- Yamauchi T, Kamon J, Ito Y (2003).** Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. *Nature*, 423, 762–769.
- Yıldırım A, Bilici M, Çayır K, Yanmaz V, Yildirim S, Tekin SB (2009).** Serum adiponectin levels in patients with esophageal cancer. *Japan J of Clinic Oncol*, 39, 92–96.



VAN VETERINARY JOURNAL



Article Copyright Transfer Agreement Form

We, the undersigned researchers, certify that; the article we have sent; is original, wasn't sent to or disapproved of potential publication by any other journal, wasn't initially published, and we bear the responsibility concerning the Scientific content and Ethical values related to the article, and transfer any kind and form of copyright related to the Article to Van Veterinary Journal since it is published in the journal, and accept that we will not make any changes wholly or partly in the article and chose as the authorized researcher.

Title of the article:

.....
.....
.....

Authors Name	Date	Signature
1.		
2.		
3.		
4.		
5.		
6.		
7.		
8.		

Authorized Researcher

Title, Name-Surname :

Full Address :

e- mail :

Tel, Fax :

Date and Signature :



Instructions for Authors

- 1- This journal is the publication of the Van Veterinary Journal and published three times a year. Abbreviated title of the journal is Van Vet J.
- 2- Original articles, observations reviews, pre-reports, scientific news, introduction of scientific books, news about the faculty, letters to editor written in Turkish and English especially in the field of Veterinary Science, Health and Life science subjects (Comprehend human and animal health) are published in this journal.
- 3- Papers are accepted for publications on the understanding that they have not been published and are not going to be considered for publication elsewhere. All responsibilities from published articles merely belong to the authors and copyright fee for authors is not paid. The article sent to the journal for publication will not be send back to authors even if it is not accepted for publication.
- 4- Papers send to the journal for publication written in Turkish or in English should contain abbreviation in the context of the International Writing Procedure and measurements should be expressed in the metric system or in SI units.
- 5- Papers should be submitted electronically via <http://vanvetderg.org> Submissions send to post are not accepted.
- 6- Papers submitted for publication should be written in Times New Roman style, 12 font size, 1.5 line spacing and 2.5 cm from all edges. Including tables, figures and graphs; original papers and reviews should not exceed 15 pages and case reports should not exceed 5 pages.
- 7- Papers written in Turkish should include English summary and papers written in English should include Turkish summary. Summaries should not exceed 1000 words. Summary should include **Aim, Material and Method, Results and Conclusion**.
- 8- In the studies requiring Ethical Commission Approval; related documents should be sending via electronic submission which is present in our submission system.
- 9- Digital images (pictures, figures etc.) should be sending as TIFF or JPEG files format at a minimum resolution of 300 dpi. Digital images should not be replaced inside the main text. Of prints of the journal will be in black and white. But the images will be given in coloured in the electronic version of the journal.
- 10- **Copyright Transfer Agreement Form** which automatically sends to the authors by the submission system after acceptance of the Paper should be signed and posted to the Editorial Office of the journal.
- 11- Apart from tables and graphs all visual elements (Photographs, drawings, diagrams etc.) should be named as **figure**. Tables and graphs are named as it is.
- 12- Definitions and names of the figures, tables and graphs should be given both in **Turkish and English** in the text.
- 13- Original research articles should be lined up as; English **Heading, Author(s) name, author(s) address, Summary and key words** and then Turkish **heading, summary and key words, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion and Conclusion, Acknowledgement or information** (if there is) and **References**.
- 14- References should be listed according to authors surname alphabetically. In the text; references should be written as surname of the author and the publication year (exp: Ceylan 2004; Ekin and Gurturk 2006; Keles et al. 2001). In the references section; short names of the journals should be written in the form approved by the [Web of Science](#). For references with more than 6 authors, only the first 3 authors should be listed, followed by 'et al.'. The references should be written as below:
Articles:
Keles I, Deger S, Altug N, Karaca M, Akdemir C (2001). Tick-borne diseases in cattle: Clinical and haematological findings, diagnosis, treatment, seasonal distribution, breed, sex and age factors and the transmitters of the diseases. *YYU Vet Fak Derg*, 12 (1-2), 26-32.
Ekin IH, Gurturk K (2006). Characterization of bovine and human group B streptococci isolated in Turkey. *J Med Microbiol*, 55, 517-521
Books:
Marrow DA (1986). Current Therapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
Books chapters:
Bahk J, Marth EH (1990). Listeriosis and Listeria monocytogenes. In: Foodborne Diseases, Cliver DO (Ed), pp: 248-256, Academic Press, San Diego.
Electronic Material: The name of the article and available web address and access date should be written.
Who (2006). Avian Influenza, February 2006, http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/ Access date: 10 January 2009.
- 15- Keywords of Turkish articles should be selected from, **Turkish Science Term's web site** (<http://www.bilimterimleri.com/>).
- 16- Information about the publication expenses for accepted papers will be given to the author(s) after determining cost.
- 17- Copyright fee will not be paid to the author(s).

Correspondence: Prof. Dr. Nihat MERT (Editor)

Yuzuncu Yil Universitesi, Veteriner Fakültesi, Dergi Editorlugu, 65080-Kampus/Van/TURKEY
e-mail: dfd@yyu.edu.tr Phone: +90 (432) 225 10 28 Fax: +90 432 225 11 27